

Aus der Klinik für Thorax- und Herz-Gefäßchirurgie

Universitätsklinikum des Saarlandes

Direktor: Prof. Dr. med. Hans-Joachim Schäfers

Genexpression in der Aorta ascendens bei Patienten
mit bicuspiden Aortenklappen

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES
DOKTORS DER MEDIZIN

der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

2015

vorgelegt von

Hilja Maria Perttunen

geboren am 22.01.1988 in Toijala, Finnland

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----------|
| 1. Zusammenfassung | 1 |
| 1.1 Zusammenfassung | 1 |
| 1.2 Summary | 3 |
| 2. Einleitung | 5 |
| 2.1 Epidemiologie von Aneurysmen der Aorta ascendens | 5 |
| 2.2 Ätiologie von Aneurysmen der Aorta ascendens | 5 |
| 2.3 Prognose und Therapie von Aneurysmen der Aorta ascendens | 6 |
| 2.4 Die bicuspide Aortenklappe | 7 |
| 2.4.1 Epidemiologie | 7 |
| 2.4.2 Morphologie der bicuspiden Aortenklappe | 7 |
| 2.4.3 Aortenaneurysmen bei bicuspiden Aortenklappe | 9 |
| 2.4.4 Pathophysiologie der Aortendilatation bei bicuspiden Aortenklappe | 10 |
| 2.4.5 Genetischer Hintergrund der Aortendilatation bei bicuspiden Aortenklappe | 11 |
| 2.4.5.1 Notch1 und Notch3 | 11 |
| 2.4.5.2 eNOS und GATA5 | 12 |
| 2.4.5.3 Fibrillin-1 und TGF- β | 13 |
| 2.4.5.4 Matrixmetalloproteinasen | 14 |
| 2.4.5.5 COL3A1 | 14 |
| 2.4.5.6 ACTA2 | 15 |
| 2.5 Fragestellung | 16 |

| | |
|--|----|
| 3. Material und Methoden | 18 |
| 3.1 Gewinnung des Probenmaterials | 18 |
| 3.2 Isolierung der RNA | 23 |
| 3.3 Bestimmung der RNA-Konzentration und -Reinheit | 26 |
| 3.4 Überprüfung der RNA-Integrität | 27 |
| 3.5 Synthese der cDNA | 31 |
| 3.6 Real-time PCR | 32 |
| 3.7 Statistische Auswertung | 36 |
| 4. Ergebnisse | 38 |
| 4.1 eNOS | 38 |
| 4.2 GATA5 | 40 |
| 4.3 NOTCH1 | 43 |
| 4.4 NOTCH3 | 46 |
| 4.5 FBN1 | 49 |
| 4.6 TGFBR1 | 52 |
| 4.7 TGFBR2 | 55 |
| 4.8 COL3A1 | 57 |
| 4.9 ACTA2 | 60 |
| 4.10 MMP19 | 63 |
| 5. Diskussion | 65 |
| 5.1 eNOS und GATA5 | 65 |
| 5.2 NOTCH1 und NOTCH3 | 68 |
| 5.3 FBN1, TGFBR1 und TGFBR2 | 71 |
| 5.4 COL3A1 | 74 |

| | |
|--------------------------------|-----------|
| 5.5 ACTA2 | 76 |
| 5.6 MMP19 | 77 |
| 5.7 Fazit | 79 |
| 6. Literaturverzeichnis | 81 |
| 7. Anhang | 88 |
| 8. Publikationen | 97 |
| 9. Danksagung | 98 |
| 10. Lebenslauf | 99 |

Abkürzungsverzeichnis

A

ACE-Hemmer

Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmer

ACTA2

smooth muscle aortic alpha-actin

ANOVA

Varianzanalyse

ApoE

Apolipoprotein E

AT1-Rezeptorantagonist

Angiotensin II-Rezeptor-Typ 1-Antagonist

B

BAV

bicuspid Aortenklappe

BAV-D

bicuspid Aortenklappe, Dilatation der Aorta ascendens

BAV-N

bicuspid Aortenklappe, keine Dilatation der Aorta ascendens

C

cDNA

komplementäre

Desoxyribonukleinsäure

COL3A1

Kollagen Typ 3, Alpha-1

D

DNase

Desoxyribonuklease

E

EIF2B1

eukaryotic translation initiation factor 2B, alpha

ELF1

E74-like factor 1

eNOS

endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthetase

F

FBN1

Fibrillin-1

FTAAD

Familiäre thorakale Aortenaneurysmen
und Dissektionen

FU

Fluoreszenzeinheiten

H

Hey

Hairy/enhancer of split-related with
Yrpw motif

Hes

Homolog of hairy/enhancer of split,
drosophila

HMBS

Hydroxymethylbilan-Synthase

K

KHK

Koronare Herzkrankheit

L

lRNA

large RNA

M

M

Mittelwert

MMP

Matrixmetalloproteinase

mRNA

messenger RNA

MYH11

smooth muscle myosin heavy chain 11

O

OD

optische Dichte

P

PCR Polymerase-Kettenreaktion

Q

qPCR quantitative Polymerase-Kettenreaktion

R

R/A Fusion zwischen der rechten und
akoronaren Tasche der Aortenklappe

RIN RNA integrity number

R/L Fusion zwischen der rechten und linken
Tasche der Aortenklappe

RNA Ribonukleinsäure

RNase Ribonuklease

RQ relative Quantität

rRNA ribosomale RNA

RT-PCR Reverse Transkriptase Polymerase-
Kettenreaktion

S

SE Standardfehler des Mittelwertes

sRNA small RNA

ST sinotubulärer Übergang

T

TAV tricuspidale Aortenklappe

TAV-D tricuspidale Aortenklappe, Dilatation der
Aorta ascendens

TAV-N tricuspidale Aortenklappe, keine
Dilatation der Aorta ascendens

TGF- β transforming growth factor beta

| | |
|--------|--|
| TGFBR1 | transforming growth factor beta- Rezeptor 1 |
| TGFBR2 | transforming growth factor beta- Rezeptor 2 |
| TIMP | tissue inhibitor of metalloproteinase |

1.1 Zusammenfassung

Hintergrund

Die bicuspide Aortenklappe ist die häufigste kongenitale kardiale Anomalie. In etwa 60 % der Fälle tritt bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen ein Aneurysma der Aorta ascendens auf, dessen Pathogenese noch nicht vollständig geklärt ist. Eine im Vergleich zu Patienten mit normalen Aortenklappen veränderte Hämodynamik in der Aorta ascendens ist bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen beschrieben und als mögliche Ursache der Aneurysmen diskutiert worden. In den letzten Jahren haben molekularbiologische Studien Hinweise auf Veränderungen in der Gen- und Proteinexpression in der Aortenwand von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen gegeben.

Fragestellung

Ziel dieser Studie war es herauszufinden, ob es Unterschiede in der Genexpression in der Aorta ascendens zwischen Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen sowie zwischen Patienten mit dilatierter Aorta ascendens und solchen ohne Aortendilatation gibt. Untersucht wurden Gene, für die bereits Zusammenhänge zur bicuspiden Aortenklappe oder zur Entstehung von Aortenaneurysmen beschrieben wurden (eNOS, GATA5, NOTCH1, NOTCH3, ACTA2, MMP19), sowie Gene, deren Mutationen ursächlich für Syndrome sind, die mit thorakalen Aortenaneurysmen einhergehen (FBN1, TGFBR1, TGFBR2, COL3A1).

Material und Methoden

Es wurden 33 Gewebeproben von Patienten mit bicuspiden- und 33 Gewebeproben von Patienten mit tricuspiden Aortenklappen untersucht. Die Proben wurden intraoperativ an der Konvexität der Aorta ascendens 5 mm oberhalb des sinotubulären Übergangs entnommen. Als Kontrollgewebe wurden Proben von Patienten mit tricuspiden Aortenklappen ohne Dilatation der Aorta ascendens verwendet. Nach Isolierung der RNA erfolgte die reverse

Transkription in cDNA und die quantitative real-time PCR. Bestimmt wurde somit die Expression der mRNA für die untersuchten Gene.

Ergebnisse

Patienten mit bicuspiden Aortenklappen haben eine signifikant höhere eNOS-Expression (mRNA) in der Aorta ascendens im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen ($p < 0,05$). Die Expression von FBN1 ist bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen signifikant niedriger als bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen ($p < 0,01$). Bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und einer Fusion der rechts- und akoronaren Tasche besteht ein Trend zur höheren Expression von NOTCH3 (BAV R/L: $M = 1,09$; $SE = 0,10$; BAV R/A: $M = 1,46$; $SE = 0,19$; $p = 0,07$) und COL3A1 (BAV R/L: $M = 1,05$; $SE = 0,09$; BAV R/A: $M = 1,42$; $SE = 0,18$; $p = 0,06$) sowie einer verminderten Expression von NOTCH1 (BAV R/L: $M = 1,17$; $SE = 0,14$; BAV R/A: $M = 0,74$; $SE = 0,07$; $p = 0,11$) im Vergleich zu Patienten mit einer Fusion der rechts- und linkskoronaren Tasche. Patienten mit größeren Durchmessern auf Höhe der tubulären Aorta ascendens (im Vergleich zum Sinus Valsalva) haben eine signifikant höhere TGFBR1-Genexpression (D1: $M = 0,98$; $SE = 0,10$; D2: $M = 0,67$; $SE = 0,09$; $p < 0,05$); es besteht ein Trend zur höheren TGFBR2-Genexpression (D1: $M = 0,78$; $SE = 0,09$; D2: $M = 0,72$; $SE = 0,15$; $p = 0,06$).

Schlussfolgerung

Die höhere eNOS-Expression in der Aortenwand von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen legt nahe, dass eNOS möglicherweise an der Entstehung von Aortenaneurysmen dieser Patienten beteiligt ist. Die Daten dieser Studie deuten zusätzlich darauf hin, dass die Aortopathie bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen genetisch bedingt ist und mit einer reduzierten Fibrillin-1-Expression einhergeht. Die verschiedenen Dilatationsmuster der Aorta ascendens unterscheiden sich in der Expression der TGF- β -Rezeptoren. Weiterhin wird tendenziell die Hypothese gestützt, dass die beiden Fusionstypen der bicuspiden Aortenklappe unterschiedliche biologische Entitäten darstellen.

1.2. Summary

Gene Expression in the Ascending Aorta in Patients with Bicuspid Aortic Valves

Background

Bicuspid aortic valves are the most common congenital heart defect. Aneurysms of the ascending aorta occur in about 60% of individuals with bicuspid aortic valves. The pathogenesis of the associated aortic dilatation in these patients has not yet been completely understood. Altered hemodynamics in the ascending aorta of patients with bicuspid aortic valves have been related to aneurysm formation. Recent molecular biological studies have discovered a possible relationship between altered gene and protein expression in the aortic wall and the early development of ascending aortic dilatation in patients with bicuspid aortic valves.

Objective

The purpose of this study was to compare gene expression levels in the ascending aortic wall from patients with bicuspid and tricuspid aortic valves and to examine a possible correlation between aortic valve morphology, aortic dilatation, and gene expression. The examined genes are associated with bicuspid aortic valves or aortic dilatation in general (eNOS, GATA5, NOTCH1, NOTCH3, ACTA2, MMP19) or are mutated in syndromes leading to frequent development of ascending aortic aneurysms (FBN1, TGFB1, TGFB2, COL3A1).

Material and Methods

Tissue samples from 33 patients with bicuspid and 33 patients with tricuspid aortic valves were examined. Tissue from patients with tricuspid aortic valves without dilatation of the ascending aorta served as controls. The samples were harvested intraoperatively at the convexity of the ascending aorta 5 mm above the sinotubular junction. A RNA isolation, followed by reverse transcription into

cDNA was performed. Gene expression was examined on the level of mRNA by quantitative real-time PCR.

Results

Patients with bicuspid aortic valves have a significantly higher eNOS expression (mRNA) in their ascending aorta compared to patients with tricuspid aortic valves ($p < 0,05$). The expression of FBN1 is significantly lower in the ascending aorta of patients with bicuspid aortic valves compared to patients with tricuspid aortic valves ($p < 0,01$). Patients with a fusion of the right and noncoronary cusp show a trend toward higher expression of NOTCH3 (BAV R/L: $M = 1,09$; $SE = 0,10$; BAV R/A: $M = 1,46$; $SE = 0,19$; $p = 0,07$) and COL3A1 (BAV R/L: $M = 1,05$; $SE = 0,09$; BAV R/A: $M = 1,42$; $SE = 0,18$; $p = 0,06$) and lower expression of NOTCH1 (BAV R/L: $M = 1,17$; $SE = 0,14$; BAV R/A: $M = 0,74$; $SE = 0,07$; $p = 0,11$) compared to patients with a fusion of the left and right coronary cusp. Patients with a dilatation of the ascending aorta have a significantly higher expression of TGFBR1 compared to patients with a dilatation at the level of the sinus of valsalva (D1: $M = 0,98$; $SE = 0,10$; D2: $M = 0,67$; $SE = 0,09$; $p < 0,05$) and show a trend toward higher expression of TGFBR2 (D1: $M = 0,78$; $SE = 0,09$; D2: $M = 0,72$; $SE = 0,15$; $p = 0,06$).

Conclusion

The upregulation on eNOS expression in the aortic wall of patients with bicuspid aortic valves suggests that eNOS may play a role in the pathogenesis of aneurysms in patients with bicuspid aortic valves. This study indicates that the aortopathy of patients with bicuspid aortic valves is genetically determined and associated with a reduced Fibrillin-1 expression. Patients with different dilatation patterns of the ascending aorta show diverging expression levels of TGF- β -receptors. Moreover the data of this study potentially support the hypothesis that the different fusion types of the bicuspid aortic valve are distinct etiological entities.

2. Einleitung

2.1 Epidemiologie von Aneurysmen der Aorta ascendens

Thorakale Aortenaneurysmen werden nach ihrer Lokalisation in Aneurysmen der Aortenwurzel, der tubulären Aorta ascendens, des Aortenbogens und der Aorta descendens eingeteilt. Mit 60 % sind sie am häufigsten im Bereich der Aortenwurzel und der tubulären Aorta ascendens lokalisiert [37]. Die Häufigkeit thorakaler Aortenaneurysmen steigt mit zunehmendem Alter, die genaue Inzidenz ist allerdings auf Grund ihres oft über lange Zeit asymptomatischen Verlaufs schwer abzuschätzen [12]. In einer Populationsstudie aus Schweden wurde eine Inzidenz von 16,3 pro 100.000 pro Jahr für Männer und 9,1 pro 100.000 pro Jahr für Frauen beschrieben [58]. Da es kein etabliertes Screening für thorakale Aortenaneurysmen gibt, werden sie häufig erst im Rahmen von Komplikationen wie einer Aortendissektion oder -ruptur diagnostiziert [72].

2.2 Ätiologie von Aneurysmen der Aorta ascendens

Aneurysmen der Aorta ascendens kommen sporadisch, im Rahmen von Syndromen, familiär gehäuft sowie in Zusammenhang mit angeborenen Anomalien der Aortenklappe vor [12,73]. Die häufigste Ursache sporadischer Aneurysmen der Aorta ascendens bei älteren Patienten sind altersbedingte degenerative Prozesse, die durch arterielle Hypertonie, Rauchen und Hyperlipidämie beschleunigt werden können [9]. Sporadische Aortenaneurysmen können weiterhin im Rahmen von Infektionen wie Syphilis oder Tuberkulose und Vaskulitiden wie der Takayasu-Arteriitis sowie posttraumatisch entstehen [23]. Zu den erblichen Syndromen, die mit Aneurysmen der Aorta ascendens einher gehen, gehören das Marfan-, das Loeys-Dietz- und das vaskuläre Ehlers-Danlos-Syndrom (Typ IV) [18,50,51]. Isolierte familiäre Aneurysmen der Aorta ascendens sind mit Mutationen in ACTA2 und MYH11 assoziiert (familial thoracic aortic aneurysms and

dissections, FTAAD) [63]. Weiterhin kommen Aneurysmen der Aorta ascendens in Zusammenhang mit angeborenen Anomalien der Aortenklappe, wie der bicuspiden und der unicuspiden Aortenklappe vor [14,57].

2.3 Prognose und Therapie von Aneurysmen der Aorta ascendens

Aortenaneurysmen entwickeln sich in der Regel symptomlos und manifestieren sich klinisch häufig erst im Rahmen einer akuten Aortendissektion [15]. Mit dem Durchmesser des Aortenaneurysmas steigt das Risiko eine Aortendissektion oder -ruptur zu erleiden. Erreicht ein Aortenaneurysma einen Durchmesser von 6 cm, beträgt das jährliche Risiko einer Aortendissektion 3,9 % und das einer Ruptur 3,7 % [19]. Die Letalität einer Aortendissektion Typ Stanford A, bei der die Aorta ascendens betroffen ist, beträgt nach Symptombeginn etwa 1 - 2 % pro Stunde [46]. In der Literatur wird eine Krankenhausletalität von etwa 12 - 26 % beschrieben [31,42]. Eine Ruptur der thorakalen Aorta geht mit einer noch höheren Letalität einher: 59 % der Betroffenen sterben vor Erreichen einer Notaufnahme, die Gesamtletalität beträgt 97-100 % [40].

Unabhängig von der Symptomatik sollte eine Operation bei Patienten mit thorakalen Aneurysmen ab einem Aortendurchmesser von 55 mm erwogen werden. In bestimmten Fällen wird die Indikation zur Operation bereits bei kleineren Aortendurchmessern gestellt. Bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen, die weitere Risikofaktoren aufweisen, sollte bereits ab einem Durchmesser von 50 mm die Indikation zur Operation erwogen werden. Bei Patienten mit Marfan-Syndrom sollte die Indikation zum Ersatz der Aorta ascendens immer ab einem maximalen Durchmesser von 50 mm und bei Vorliegen weiterer Risikofaktoren bereits ab einem Durchmesser von 45 mm gestellt werden [41].

2.4 Die bicuspide Aortenklappe

2.4.1 Epidemiologie

Die bicuspide Aortenklappe ist die häufigste kongenitale kardiale Anomalie. Sie kommt mit einer Prävalenz von 0,5 – 2 % vor [3,64] und ist häufig mit anderen angeborenen Herzfehlern wie Aortenisthmusstenose, Ventrikelseptumdefekt und persistierendem Ductus arteriosus assoziiert [11]. Männer haben mit einem Verhältnis von 3 : 1 häufiger bicuspide Aortenklappen als Frauen [70]. Roberts et al. fanden bei 49 % der Patienten, die an einer Aortenklappenstenose operiert wurden, eine bicuspide und bei 45 % eine tricuspide Aortenklappe. Somit kommt die bicuspide Aortenklappe in herzchirurgischen Patientenkollektiven sogar häufiger vor als die normale tricuspide Aortenklappe [65].

2.4.2 Morphologie der bicuspiden Aortenklappe

Normalerweise besteht die Aortenklappe aus drei Taschen und besitzt drei Kommissuren an den Grenzen der einzelnen Taschen. Eine bicuspide Aortenklappe hat nur zwei Taschen und zwei Kommissuren [39]. Anhand der Fusion der Taschen können drei Varianten der bicuspiden Aortenklappe unterschieden werden, wobei die Fusion der rechts- und linkskoronaren Tasche am häufigsten vorkommt (86 %). Seltener sind Fusionen der rechts- und akoronaren Tasche (12 %) sowie der links- und akoronaren Tasche (3 %) (Abbildung 1) [66]. Eine Asymmetrie der Taschen liegt in der Regel vor; in 2 % der Fälle ist die fusionierte Tasche sogar doppelt so groß wie die nicht-fusionierte [66]. In etwa 75 % der Fälle befindet sich an der Stelle der fehlenden Kommissur eine fibröse Raphe, deren Größe und Gewebedichte variiert [66].

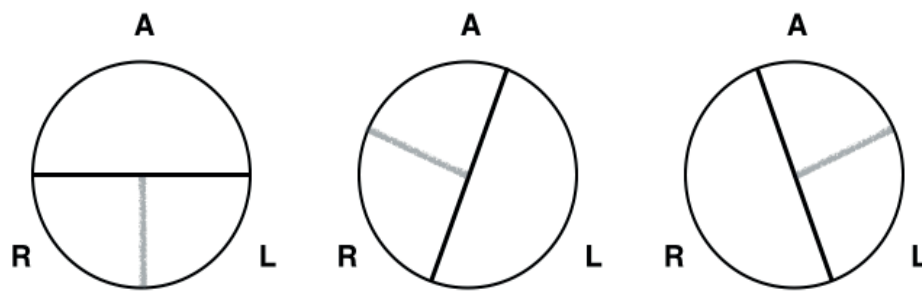


Abbildung 1: Fusionstypen der bicuspiden Aortenklappe; die schwarze kreishalbierende Linie symbolisiert die voll entwickelte Kommissur, die graue Linie symbolisiert die fusionierte Kommissur (Raphe); links: Fusion der rechts- und linkskoronaren Tasche, Mitte: Fusion der rechts- und akoronaren Tasche, rechts: Fusion der links- und akoronaren Tasche; R = rechtskoronare Tasche, L = linkskoronare Tasche, A = akoronare Tasche. Abb. modifiziert nach Sabet et al. 1999 [66].

Die Fusion der Aortenklappe kann mit einer valvulären Dysfunktion einhergehen und zu einer Aortenklappenstenose und/oder -Insuffizienz führen [11]. Weiterhin stellen strukturelle Klappenanomalien wie die bicuspide Aortenklappe einen wichtigen Risikofaktor für eine infektiöse Endokarditis dar [13].

Die Entwicklung der bicuspiden Aortenklappe wurde in morphologischen Studien an Tiermodellen untersucht [27,67]. Bei syrischen Hamstern konnten Fernandez et al. durch systematische Inzucht bei 58 % der Tiere bicuspide Aortenklappen erzeugen. Bei Mäusen mit einem Knockout des Gens, das für die endotheliale NO-Synthetase codiert, lag die Rate an bicuspiden Aortenklappen bei 32 % [27]. Die Mäuse wiesen einen rechts-akoronaren Fusionstyp auf, die syrischen Hamster hingegen eine Fusion der rechts- und linkskoronaren Tasche. Die Autoren gehen davon aus, dass den unterschiedlichen Fusionstypen jeweils eigene Entwicklungsmechanismen zu Grunde liegen. Bei den rechts-akoronar fusionierten Aortenklappen der eNOS-

Knockout-Mäuse konnte eine gestörte Entwicklung der Endokardkissen des Ausflusstraktes nachgewiesen werden. Die rechte Tasche zeigte morphologische Auffälligkeiten, wohingegen sich die linke Tasche normal entwickelte. Die rechts-linkskoronar fusionierten Aortenklappen der syrischen Hamster entstanden aufgrund einer gestörten Septierung des Ausflusstraktes [27].

2.4.3 Aortenaneurysmen bei bicuspidaler Aortenklappe

Etwa 50 - 70 % der Patienten mit bicuspidalen Aortenklappen entwickeln im Laufe ihres Lebens eine Dilatation der Aorta ascendens, die auch ohne hämodynamische Funktionsstörungen der Aortenklappe vorkommen kann [14,17]. Bereits im Kindesalter haben Patienten mit bicuspidalen Aortenklappen größere Durchmesser der Aorta ascendens im Vergleich zu Patienten mit tricuspidalen Aortenklappen [7]. In echokardiographischen Studien wurden verschiedene Dilatationsmuster der Aorta ascendens bei Patienten mit bicuspidalen Aortenklappen beschrieben. Die Form der Aortendilatation scheint je nach vorliegendem Fusionstyp der bicuspidalen Aortenklappe zu variieren. Die Mehrheit der Patienten mit rechts-akoronarem Fusionstyp weist die größten Durchmesser im Bereich der tubulären Aorta ascendens auf. Im Vergleich hierzu liegt bei Patienten mit rechts-links fusionierter Aortenklappe vor allem eine Dilatation auf Höhe des Sinus Valsalva vor [21,68].

Patienten mit bicuspidaler Aortenklappe haben ein neunfach erhöhtes Risiko eine Aortendissektion zu entwickeln und erleiden diese im Mittel in der 6. Lebensdekade und damit eine Dekade früher als Patienten mit tricuspidalen Aortenklappen [45]. Etwa 5 % aller Aortendissektionen werden durch das Marfan-Syndrom verursacht [24]. Patienten mit Marfan-Syndrom haben unbehandelt ein Lebenszeitrisiko von 50 % eine Aortendissektion zu entwickeln [24]. Obwohl Patienten mit bicuspidalen Aortenklappen seltener eine Dissektion entwickeln, ist durch ihre höhere Prävalenz im Vergleich zum Marfan-Syndrom davon auszugehen, dass bicuspide Aortenklappen in der Gesamtpopulation

häufiger die Ursache einer Aortendissektion sind als das Marfan-Syndrom [70].

2.4.4 Pathophysiologie der Aortendilatation bei bicuspidaler Aortenklappe

Die Pathogenese von thorakalen Aortenaneurysmen bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen ist noch nicht vollständig geklärt. Lange Zeit wurde angenommen, dass thorakale Aortenaneurysmen durch degenerative Prozesse entstehen, die histologisch durch eine zystische Medianekrose der Aortenwand charakterisiert sind [23]. Einige Autoren sehen die Ursache der stärker ausgeprägten Medianekrose und Aneurysma-Entstehung bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen in physikalischen Änderungen des aortalen Blutflusses, die durch die veränderte Morphologie der Aortenklappe hervorgerufen werden. Bauer et al. zeigten in einer echokardiographischen Studie, dass bei Patienten mit stenosierten bicuspiden Aortenklappen die anterolaterale Region der Aorta ascendens größeren Scherkräften ausgesetzt ist als bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen [5].

Hope et al. konnten mit einer vierdimensionalen Magnetresonanztomographie bei 75 % der untersuchten Patienten mit bicuspiden Aortenklappen einen helikalen systolischen Blutfluss nachweisen, der bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen nicht vorlag. Dieses Flussprofil zeigte sich auch bei normalen Aortendurchmessern, weshalb die Autoren postulieren, dass Änderungen in der Blutströmung bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen zur Genese der Aneurysmen beitragen und nicht erst sekundär durch diese verursacht werden [36]. Die Flussrichtung des Blutes in der Aorta ascendens ist je nach vorliegendem Fusionstyp der bicuspiden Aortenklappe unterschiedlich. Bei einer rechts-links-fusionierten Aortenklappe überwiegt eine rechts-anteriore Flussrichtung, bei rechts-akoronarer Fusion zeigt sich vermehrt ein links-posteriorer Fluss entlang der Aorta ascendens [36].

In histologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass degenerative

Veränderungen sowohl in der Aorta ascendens als auch im Truncus pulmonalis bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen stärker ausgeprägt sind als bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen [20]. Die Media der Aorta von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen ist unabhängig von der Klappenfunktion verändert, was für eine angeborene Genese der Mediaschwäche spricht [56]. Unterschiede zeigen sich im Ausmaß der zystischen Medianekrose, der Fragmentierung elastischer Fasern und in der Ausrichtung der glatten Muskelzellen [20]. Die elastischen Fasern in der Media der Aorta ascendens sind bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen dünner als bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen, wobei in der Gesamtdicke der Media kein Unterschied besteht [4].

2.4.5 Genetischer Hintergrund der Aortendilatation bei bicuspiden Aortenklappen

In den letzten Jahren konnte eine Vielzahl an molekularbiologischen Studien Hinweise dafür liefern, dass die Entstehung von Aortenaneurysmen bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen vermutlich nicht ausschließlich hämodynamisch bedingt ist [1,25]. Hieraus ging die Hypothese hervor, dass bicuspiden Aortenklappen mit einer hereditären Aortopathie assoziiert sein könnten, die zur Entwicklung von thorakalen Aortenaneurysmen prädisponiert.

2.4.5.1 Notch1 und Notch3

Säugetiere besitzen vier verschiedene Notch-Rezeptoren, NOTCH1 - 4, die jeweils aus einer extrazellulären Liganden-Bindungsstelle und einer intrazellulären Domäne zur Signaltransduktion bestehen [2]. Bisher sind insgesamt fünf Liganden der Notch-Rezeptoren bei Säugetieren bekannt (Jagged1, Jagged2 und Delta-like1, 3 und 4) [69]. Durch Regulierung der Aktivität der Transkriptionsfaktoren Hey und Hes spielt der Notch-Signalweg eine entscheidende Rolle in der kardialen Embryogenese [60]. In zwei Familien mit autosomal-dominant vererbten bicuspiden Aortenklappen konnten Mutationen im NOTCH1-Gen als ursächlich identifiziert werden [30]. In

Sequenzanalysen wurde nachgewiesen, dass auch ein Teil der sporadisch auftretenden bicuspiden Aortenklappen mit Mutationen im NOTCH1-Gen assoziiert sind [53,54]. Für ein weiteres Mitglied der NOTCH-Familie wurde ein Zusammenhang zu thorakalen Aortenaneurysmen beschrieben: Folkersen et al. zeigten, dass die Genexpression von NOTCH3 in dilatierten Aorten von Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen hochreguliert ist [28]. Diese Daten legen nahe, dass die Pathogenese der bicuspiden Aortenklappe und der mit ihr assoziierten Aneurysma-Entstehung entscheidend durch die Aktivität der NOTCH-Rezeptoren beeinflusst wird.

2.4.5.2 eNOS und GATA5

Ein weiteres Protein, für dessen Zusammenhang zur Pathogenese der bicuspiden Aortenklappe es wachsende Evidenz gibt, ist die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthetase (eNOS). Eine eNOS-Defizienz führt bei Mäusen zu einer Herzinsuffizienz und kongenitalen Septumdefekten [26]. Interessanterweise führt ein Knockout von eNOS bei Mäusen auch zu einem gehäuften Auftreten von bicuspiden Aortenklappen [47]. Bei Mäusen mit einem Doppelknockout von eNOS und Apolipoprotein E (apoE), die mit einer cholesterinreichen Diät ernährt wurden, kam es weiterhin gehäuft zu einer koronaren Herzkrankheit, myokardialen Ischämien und vaskulären Komplikationen wie abdominellen Aortenaneurysmen und Aortendissektionen [43]. Dass eNOS auch bei Menschen eine Rolle in der Entstehung der Aortendilatation bei bicuspiden Aortenklappen spielen mag, zeigen Daten von Aicher et al., die in der Aortenwand von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen eine niedrigere eNOS-Proteinexpression im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen nachgewiesen haben. Weiterhin wurde eine inverse Korrelation zwischen der eNOS-Proteinexpression und dem sinotubulären sowie dem maximalen Aortendurchmesser bei Vorliegen einer bicuspiden Aortenklappe beschrieben [1].

Die Transkription von eNOS wird durch GATA5 reguliert, einen Transkriptionsfaktor, der hauptsächlich in den Endokardzellen und den Endokardkissen des kardialen Ausflusstraktes exprimiert wird [44]. Analog zum

eNOS-Knockout führt auch ein GATA5-Knockout bei Mäusen gehäuft zur Entstehung von bicuspiden Aortenklappen [44]. Padang et al. stellten erstmals beim Menschen einen Zusammenhang zwischen GATA5 und bicuspiden Aortenklappen her, indem sie vier verschiedene nicht-synonyme seltene genetische Varianten in den transkriptionellen Aktivator-Domänen von GATA5 bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen nachwiesen [59]. GATA5 und eNOS scheinen somit eine wichtige Rolle sowohl bei der Entstehung von kongenitalen Klappenanomalien als auch bei der damit assoziierten Dilatation der Aorta zu spielen.

2.4.5.3 Fibrillin-1 und TGF- β

Aktivitätsänderungen des TGF- β -Signalweges sind mit Syndromen assoziiert, bei denen Aneurysmen der Aorta ascendens gehäuft vorkommen. Mutationen in den Genen, die für die transforming growth factor beta-Rezeptoren 1 und 2 (TGFB1, TGFB2) codieren, sind ursächlich für das Loeys-Dietz-Syndrom, das autosomal-dominant vererbt wird und mit einer frühen Entstehung von Aortenaneurysmen einhergeht [49]. Ein wichtiger Regulator des TGF- β -Signalweges ist Fibrillin-1, das Bestandteil der Mikrofibrillen der extrazellulären Matrix ist. Mutationen im Fibrillin-1-Gen, die dem Marfan-Syndrom zugrunde liegen [22], erhöhen die Bioverfügbarkeit von aktivem TGF β 1 und führen damit zu einer Dysregulation des Signalweges [16]. In der Aorta ascendens und im Truncus pulmonalis von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen wurde ein verminderter Fibrillin-1-Gehalt im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass Fibrillin-1 auch in der Pathogenese der Aortendilatation bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen eine Rolle spielen mag [25]. Hierfür sprechen auch die Ergebnisse von Pepe et al., die in ihrer Studie bei zwei von zehn untersuchten Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und einer Aortendilatation Mutationen im Fibrillin-1-Gen identifiziert haben. Bei allen Patienten lag nach den klinischen Gent-Kriterien kein Marfan-Syndrom vor [61].

2.4.5.4 Matrixmetalloproteinasen

Fedak et al. zeigten bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen neben einem verminderten Fibrillin-1-Gehalt eine im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen mehr als doppelt so hohe Aktivität der Matrixmetalloproteinase 2. Die Aktivität der Matrixmetalloproteinase 2 korrelierte positiv mit dem Aortendurchmesser dieser Patienten [25]. Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sind Zink-abhängige Endopeptidasen, die verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix abbauen [71]. Eine hemmende Wirkung auf MMPs hat die Gruppe der Gewebeinhibitoren der Metalloproteinasen (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases, TIMPs) [55]. Das Gleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs spielt eine wichtige Rolle im vaskulären Remodeling und in der Angiogenese [62]. Jackson et al untersuchten die mRNA-Expression von 23 MMPs und deren Inhibitoren in der Aorta ascendens von Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen. Für MMP14 und MMP19 konnten erhöhte Expressionen in den dilatierten Aorten beider Patientengruppen nachgewiesen werden, wobei MMP19 bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen positiv mit dem maximalen Aortendurchmesser korrelierte [38].

2.4.5.5 COL3A1

Das Gen COL3A1 codiert für die $\alpha 1(\text{III})$ -Kette des Kollagen Typ III. Strukturelle Defekte in dieser Kette führen zum vaskulären Typ des Ehlers-Danlos-Syndroms (Typ IV) [6]. Wågsäter et al. wiesen eine signifikant niedrigere COL3A1-Genexpression in der dilatierten Aorta ascendens bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen nach. Auch die Quervernetzung der Kollagenfasern ist in der dilatierten Aorta von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen vermindert [74]. Somit scheint COL3A1 nicht nur bei syndromalen Aortenaneurysmen, sondern auch in der Entstehung der Aortendilatation bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen eine relevante Rolle zu spielen.

2.4.5.6 ACTA2

Bei Patienten mit familiären Aortenaneurysmen kann ursächlich eine Mutation im ACTA2-Gen, das für das Alpha-Aktin der glatten Gefäßmuskulatur codiert, vorliegen. Renard et al. konnten in ihrer Studie bei 16 % der untersuchten Patienten mit familiären Aortenaneurysmen Mutationen im ACTA2-Gen nachweisen [63]. Interessanterweise sind Mutationen in ACTA2 in einigen Fällen mit bicuspiden Aortenklappen assoziiert [32,63]. Forte et al. beschrieben in ihrer Studie eine höhere ACTA2-Genexpression in der Konvexität der Aorta ascendens bei Patienten mit stenosierten bicuspiden Aortenklappen im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen [29]. Diese Daten legen nahe, dass auch ACTA2 eine Rolle in der Pathogenese der bicuspiden Aortenklappe zukommen mag.

2.5 Fragestellung

Eine Vielzahl an Genen konnte identifiziert werden, für die es einen Zusammenhang zur Pathogenese der Aortenaneurysmen bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen geben mag. Allerdings handelt es sich hierbei meist um auf einzelne Gene beschränkte Beobachtungen, zwischen denen ein klarer Zusammenhang hinsichtlich der Interaktionen und Aktivitätsmuster fehlt. Bessere Kenntnis über die pathophysiologischen Hintergründe, die zu Aortenaneurysmen bei diesen Patienten führen, könnte klinisch hilfreiche Strategien zur Prävention von Aortendissektionen liefern und eine Grundlage für neue Medikamente bilden.

In der hier vorgelegten Studie wurden daher die Expressionsmuster von Genen untersucht, für die bereits in der Literatur ein Zusammenhang zur Entstehung von bicuspiden Aortenklappen (eNOS, GATA5, NOCT1) oder einer Aortendilatation (eNOS, NOTCH3) beschrieben ist.

1. Ist die Genexpression von GATA5 und dessen Zielgen eNOS in der Aorta ascendens bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen analog zur eNOS Proteinexpression erniedrigt?
2. Ist die Genexpression von NOTCH1, dessen Mutationen sowohl mit familiären als auch mit sporadischen bicuspiden Aortenklappe assoziiert sind, in der Aortenwand von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen vermindert und verhält sich die Genexpression von NOTCH3 analog dazu?

Weiterhin wurde die Expression von Genen bestimmt, deren Mutationen dem Marfan- und Loeys-Dietz-Syndrom zu Grunde liegen (FBN1, TGFBR1, TGFBR2) und auch in einigen Fällen bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen nachgewiesen wurden (FBN1).

3. Ist die Genexpression von FBN1 sowie von TGFBR1 und TGFBR2, deren Mutationen zu syndromalen Aortenaneurysmen führen, in der Aorta ascendens bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen vermindert?

Darüber hinaus wurde die Expression von Genen untersucht, die für strukturelle Bestandteile der Aortenwand codieren und deren Mutationen oder veränderte Expression mit Aortenaneurysmen assoziiert sind (COL3A1, ACTA2, MMP19). Für diese Gene gibt es auch Hinweise dafür, dass sie möglicherweise mit Aortenaneurysmen bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen assoziiert sind.

4. Ist die Genexpression von COL3A1, dessen Mutationen dem vaskulären Ehlers-Danlos-Syndrom zugrunde liegen, in der Aortenwand von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen niedriger als bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen?
5. Ist die Genexpression von ACTA2, dessen Mutationen bei Patienten mit familiären Aortenaneurysmen und vereinzelt in Zusammenhang mit bicuspiden Aortenklappen beschrieben wurden, in der Aortenwand von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen erhöht?
6. Ist die Genexpression von MMP19 bei Vorliegen einer Aortendilatation hochreguliert?

3. Material und Methoden

3.1 Gewinnung des Probenmaterials

Die untersuchten Gewebeproben wurden von Patienten entnommen, die eine Rekonstruktion oder einen Ersatz der Aortenklappe mit oder ohne Ersatz der Aorta ascendens erhielten. Alle Patienten hatten in die Entnahme der Proben schriftlich eingewilligt und die Studie war von der Ethik-Kommission der Ärztekammer des Saarlandes mit positivem Votum begutachtet worden (Kenn-Nr. 205/10). Es wurden Alter, Geschlecht, Begleiterkrankungen und Medikationen der Patienten erhoben. Eine transösophageale Echokardiographie wurde präoperativ bei jedem Patienten durchgeführt. Die Durchmesser der Aorta wurden dabei auf Höhe des aortoventrikulären und sinotubulären Überganges sowie auf Höhe des Sinus Valsalva und der tubulären Aorta ascendens gemessen (Abbildung 2). Die Gewebestücke wurden intraoperativ an der Konvexität der Aorta ascendens etwa 5 mm oberhalb des sinotubulären Übergangs entnommen, unmittelbar in Flüssigstickstoff konserviert und anschließend bei -80°C eingefroren. Insgesamt wurden Gewebeproben von 66 Patienten untersucht. Als dilatiert wurde jede Aorta mit einem Sinus- oder tubulären Ascendens-Durchmesser von ≥ 40 mm betrachtet. Die Aufteilung nach Klappenmorphologie und Dilatation ergab vier verschiedene Patientengruppen (Tabelle 1). Die klinischen Daten der Patienten sind in Tabelle 2 aufgeführt.

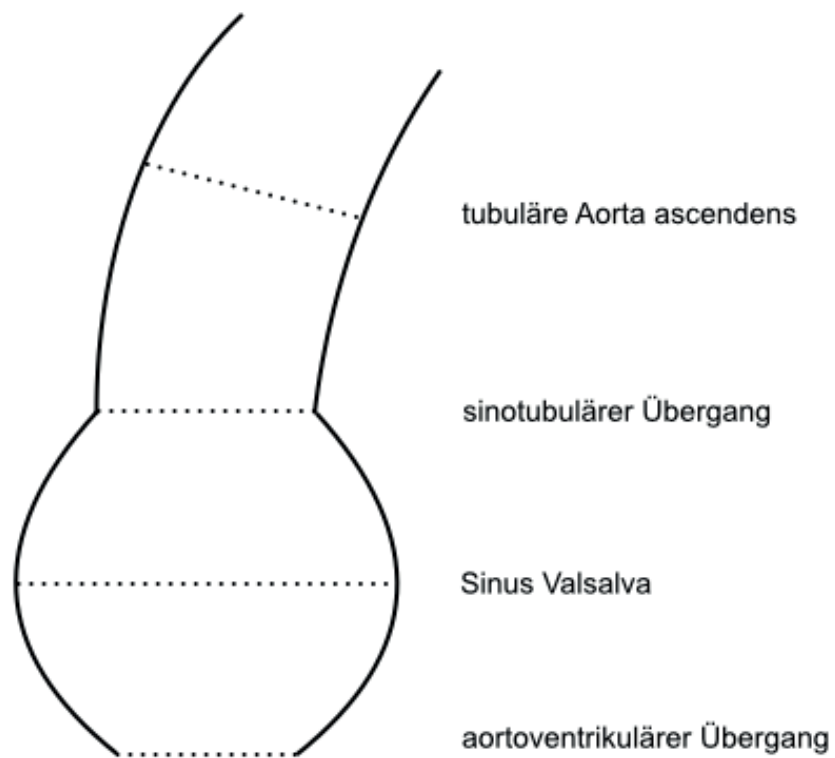


Abbildung 2: Übersicht der präoperativ mittels transthorakaler Echokardiographie bestimmten Durchmesser

| | BAV-D (n = 23) | BAV-N (n = 10) | TAV-D (n = 11) | TAV-N (n = 22) | <i>p</i> |
|-------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------|
| Alter (Jahre) | | | | | |
| M | 52,8 | 55,2 | 56,6 | 65,8 | 0,00 |
| SE | ± 3,6 | ± 4,9 | ± 4,2 | ± 2,9 | |
| Geschlecht (m/w) | 22/1 | 9/1 | 8/3 | 10/12 | 0,00 |
| Maximaler Aortendurchmesser (mm) | | | | | |
| M | 44,6 | 34,0 | 47,7 | 29,0 | 0,00 |
| SE | ± 1,7 | ± 1,4 | ± 2,9 | ± 0,9 | |
| Spannweite | 40-57 | 25-38 | 40-60 | 21-37 | -- |

Tabelle 1: Untersuchte Patientengruppen: Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta ascendens (BAV-D), Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und normal weiter Aorta ascendens (BAV-N), Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta ascendens (TAV-D), sowie tricuspiden Aortenklappen und normal weiter Aorta ascendens (TAV-N). M = Mittelwert, SE = Standardfehler

| | bicuspid (n = 33) | tricuspid (n = 33) | <i>p</i> |
|--------------------------|----------------------|-----------------------|----------|
| Alter | 53,6 ± 16,6 | 62,8 ± 14,2 | 0,00 |
| Geschlecht (m/w) | 31/2 | 18/15 | 0,00 |
| Aortenklappen-Pathologie | | | |
| Stenose | 4 (12,5%) | 4 (12,1%) | 0,27 |
| Insuffizienz | 24 (75,0%) | 23 (69,7%) | 0,12 |
| Kombiniertes Vitium | 4 (12,5%) | 6 (18,2%) | 0,00 |
| Begleiterkrankungen | | | |
| Hypertonie | 10 (31,3%) | 21 (63,6%) | 0,00 |
| Diabetes mellitus | 0 | 5 (15,2%) | 0,02 |
| Hyperlipidämie | 8 (25,0%) | 10 (30,3%) | 0,03 |
| KHK | 2 (6,3%) | 6 (18,2%) | 0,20 |
| gegenwärtiges Rauchen | 3 (9,4%) | 4 (12,1%) | 0,79 |
| Medikation | | | |
| β-Blocker | 12 (37,5%) | 17 (53,1%) | 0,26 |
| ACE-Hemmer | 13 (40,6%) | 16 (48,5%) | 0,49 |
| AT1-Rezeptor-Antagonist | 6 (18,8%) | 7 (21,2%) | 0,31 |
| Diuretikum | 9 (28,1%) | 10 (30,3%) | 0,25 |
| Insulin | 0 | 2 (6,1%) | 0,21 |
| Kalziumkanal Blocker | 2 (6,3%) | 6 (18,2%) | 0,20 |
| Statin | 7 (21,9%) | 12 (36,4%) | 0,01 |
| Aldosteron-Antagonist | 2 (6,3%) | 7 (21,2%) | 0,11 |

Tabelle 2: Klinische Daten der Patienten, KHK = Koronare Herzkrankheit, ACE-Hemmer = Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmer, AT1-Rezeptor-Antagonist = Angiotensin II-Rezeptor-Typ 1- Antagonist

Patienten mit bicuspiden Aortenklappen wurden nach den verschiedenen Fusionstypen in zwei Gruppen aufgeteilt. Eine Fusion der rechts- und linkskoronaren Tasche (BAV R/L) lag bei 25 Patienten vor, wobei die Aorta bei 16 Patienten dilatiert war. Bei acht Patienten lag eine Fusion der rechts- und akoronaren Tasche vor (BAV R/A), wobei die Aorta in sieben Fällen dilatiert war (Tabelle 3).

| | BAV R/L | BAV R/A |
|------------|---------|---------|
| Anzahl | 25 | 8 |
| Dilatation | 16 | 7 |

Tabelle 3: Aufteilung der Patienten mit bicuspiden Aortenklappen nach dem vorliegenden Fusionstyp, BAV R/L = Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und einer rechts-linkskoronaren Fusion, BAV R/A = Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und einer rechts-akoronaren Fusion

Weiterhin wurden die Patienten mit dilatierten Aorten in zwei Gruppen aufgeteilt. War der tubuläre Aortendurchmesser größer als der Durchmesser auf Höhe des Sinus Valsalva, so wurden die Patienten der Gruppe D1 zugeordnet. Bei einem größeren Sinus-Durchmesser im Vergleich zum Durchmesser der tubulären Aorta ascendens wurden die Patienten in die Gruppe D2 eingeteilt (Tabelle 4).

| | D1 | D2 |
|-------|----|----|
| BAV-D | 15 | 8 |
| TAV-D | 6 | 5 |

Tabelle 4: Aufteilung der Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta ascendens (BAV-D) und Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta ascendens (TAV-D) nach Dilatationsmuster. D1 = tubuläre Aorta ascendens > Sinus Valsalva, D2 = Sinus Valsalva > tubuläre Aorta ascendens

3.2 Isolierung der RNA

Verwendete Reagenzien:

mirVana PARIS Kit #1556 (Ambion)

- Cell Disruption Buffer
- 2X Denaturation Solution
- Acid-Phenol:Chloroform
- miRNA Wash Solution 1
- Wash Solution 2/3
- Elution Solution

RNase-Free DNase Set #79254 (Qiagen)

- DNase I, RNase-Free
- Buffer RDD
- RNase-Free Water

Ethanol 100 %

β-Mercaptoethanol

Nuklease-freies Wasser

Verwendete Geräte:

Waage BP 310 S (Sartorius)

Ultraturrax T8 (IKA)

Ultraschallprozessor UP100H (Hielscher)

MS2 Minishaker (IKA)

Centrifuge 5415 R (Eppendorf)

Thermomixer Comfort (Eppendorf)

Die RNA-Isolierung wurde mit dem mirVana PARIS Kit der Firma Ambion durchgeführt. Für den DNase-Verdau wurde das RNase-Free DNase Set der Firma Qiagen angewendet.

Vor Beginn der RNA-Isolierung war ein Teil der Reagenzien vorzubereiten. Die 2X Denaturation Solution wurde mit 375 µl β-Mercaptoethanol vermischt. Anschließend erfolgte eine Erwärmung der Mischung im Wasserbad auf 37°C. 21 ml reines Ethanol wurden zur miRNA Wash Solution 1 und 40 ml reines Ethanol zur Wash Solution 2/3 hinzugegeben. In das Gefäß der DNase I wurden 550 µl Nuklease-freies Wasser mit einer Kanüle injiziert und das Gefäß vorsichtig geschwenkt. Das Gesamtvolumen wurde anschließend auf 1,7 ml Reaktionsgefäße mit jeweils 20 µl aufgeteilt und die Reaktionsgefäße bei - 20°C aufbewahrt.

Während der gesamten RNA-Isolierung wurden die Reaktionsgefäße stets auf Eis gekühlt. Zunächst wurden 625 µl Cell Disruption Buffer in ein steriles 13 ml Röhrchen pipettiert und dieses gewogen (Präzisionswaage BP 310S, Sartorius). Die Gewebeprobe wurde aus dem Tiefkühlschrank (- 80°C) genommen und unmittelbar dem Cell Disruption Buffer hinzugefügt. Anschließend wurde das Gewicht des Röhrchens neu bestimmt. Aus der Differenz der beiden Gewichte wurde das jeweilige Probengewicht ermittelt, welches zwischen 20 und 100 mg lag. Zu der Probe und dem Cell Disruption Buffer wurden im nächsten Schritt 625 µl Denaturation Solution hinzugefügt. Die Probe wurde mit einem Ultra-Turrax T8 (IKA) zerkleinert, bis die Mischung homogen war und sich mit der Pipette aufziehen ließ. Ein zweiter Homogenisierungsschritt erfolgte für 3 s mit dem Ultraschallprozessor UP100H (Hielscher). Anschließend wurde die Mischung 30 min auf Eis inkubiert und danach das Gesamtvolumen auf zwei 1,7 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt.

Acid-Phenol:Chloroform wurde in einer Menge, die dem 1,25-fachen des Volumens in einem der Reaktionsgefäße entsprach, der Mischung hinzugefügt. Die Reaktionsvolumina wurden für wenige Sekunden mit dem MS2 Minishaker (IKA) gemischt und danach bei 4°C und 13 000 g für 20 min zentrifugiert (Centrifuge 5415 R, Eppendorf). Nach der Zentrifugierung wurde der klare Flüssigkeitsüberstand, der die RNA enthielt, in ein neues 1,7 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend wurde das Volumen gemessen und ein Drittel der Menge an reinem Ethanol hinzugefügt. Nach gründlichem Mischen mit der

Pipette wurden 700 µl des Volumens auf einen Filter eines Ambion-Reaktionsgefäßes pipettiert und dieses bei 4°C und 9000 g für 30 s zentrifugiert. Das maximale Volumen, das in diesem Schritt auf den Filter gegeben werden kann, beträgt 700 µl. Daher wurde dies so oft wiederholt, bis das gesamte Volumen verbraucht worden war. Zur Gewinnung der small RNA (sRNA) wurden die Durchschläge nach den einzelnen Zentrifugierungen in einem 1,7 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Nach dem Messen dieses Volumens wurden zwei Drittel der Menge an reinem Ethanol hinzugefügt. Anschließend wurde das Reaktionsvolumen gründlich mit der Pipette vermischt. 700 µl der Ethanolmischung wurden auf einen Filter eines Ambion-Reaktionsgefäßes pipettiert und dieses bei 4°C und 9000 g für 30 s zentrifugiert. Der entstandene Durchschlag wurde verworfen und dieser Schritt so oft wiederholt, bis das gesamte Volumen verbraucht war.

Um sowohl die large RNA (lRNA) als auch die sRNA aus den jeweiligen Filtern zu lösen, wurden mehrere Waschschrte der Filter durchgeführt. 350 µl miRNA Wash Solution 1 wurden auf beide Filter pipettiert und die Filter in den Ambion-Reaktionsgefäßen bei 4°C und 9000 g für 30 s zentrifugiert. Der entstandene Durchschlag wurde jeweils verworfen. Zur Vermeidung einer Kontamination mit DNA wurde ein DNase-Verdau mit dem RNase-Free DNase Set (Qiagen) durchgeführt. Auf jeden Filter wurden 80 µl bestehend aus jeweils 70 µl RDD Puffer und 10 µl DNase I-Lösung pipettiert. Die Proben wurden anschließend bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Nachdem 100 µl Elution Solution in ein 1,7 ml Reaktionsgefäß pipettiert worden waren, wurde dieses im Thermomixer comfort (Eppendorf) auf 96°C erhitzt. 350 µl miRNA Wash Solution wurden nach der Inkubation erneut auf beide Filter pipettiert. Anschließend wurden diese in den Ambion-Reaktionsgefäßen bei 4°C und 9000 g für 30 s zentrifugiert. Der entstandene Durchschlag wurde jeweils verworfen. Anschließend wurden 500 µl Wash Solution 2/3 auf beide Filter gegeben und diese in den Ambion-Reaktionsgefäßen erneut bei 4°C und 9000 g für 30 s zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt und der entstandene Durchschlag nach jeder Zentrifugierung verworfen. Um die Filter zu trocknen, wurden diese in den Ambion Reaktionsgefäßen bei 4°C und 9000 g für 30 s

zentrifugiert. Vor dem letzten Schritt wurden die Filter in neue Ambion-Reaktionsgefäße positioniert, um mögliche Verunreinigungen zu vermeiden. Von der Elution Solution wurden jeweils 40 µl auf beide Filter pipettiert und die Ambion-Reaktionsgefäße bei 4°C und 9000 g für 1 min zentrifugiert. Die somit erhaltenen Durchschläge enthielten die lRNA und sRNA.

3.3 Bestimmung der RNA-Konzentration und -Reinheit

Verwendete Geräte:

Infinite NanoQuant Plate (Tecan)

Infinite 200 PRO NanoQuant Reader (Tecan)

Zur photometrischen Bestimmung der RNA-Reinheit und -Konzentration wurde eine Infinite NanoQuant Plate und ein Infinite 200 PRO NanoQuant Reader sowie die i-control-Microplate Reader Software der Firma Tecan verwendet. Das Absorptionsmaximum von RNA liegt bei 260 nm, das von Proteinen bei 280 nm. Durch die Bildung des Quotienten OD_{260} zu OD_{280} kann auf eine Kontamination mit Proteinen geschlossen werden. Dieser Quotient sollte idealerweise zwischen 1,8 und 2,1 liegen. Es wurden nur Proben, für die ein Quotient in diesem Bereich gemessen wurde, in die Studie miteinbezogen.

Die Pipettierfelder der Infinite NanoQuant Plate wurden zur Eichung zunächst mit je 2 µl Elution Solution belegt. Anschließend wurde die Elution Solution von den Feldern entfernt und je 2 µl der zu messenden Proben RNA auf die Felder pipettiert. Nach erfolgter Konzentrationsbestimmung wurde die restliche RNA bei – 80 °C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

3.4 Überprüfung der RNA-Integrität

Verwendete Reagenzien:

RNA 6000 Nano Kit # 5067-1511 (Agilent)

- RNA 6000 Nano Marker
- RNA 6000 Nano Gel Matrix
- RNA Nano Dye Concentrate
- RNA 6000 Ladder
- Safe-Lock tubes, DNase/RNase-frei (Eppendorf)
- Spin Filter

RNaseZAP # AM9780 (Ambion)

Nuklease-freies Wasser

Verwendete Geräte und Materialien:

Agilent 2100 Bioanalyzer

Chip Priming Station (Agilent)

16-Pin Bajonett Elektroden-Einsatz (Agilent)

Centrifuge 5415 R (Eppendorf)

Thermomixer comfort (Eppendorf)

MS2 Minishaker (IKA)

MS3 basic S36 Chip Vortexer (IKA)

RNA 600 Nano Chips (Agilent)

Electrode Cleaner Chips (Agilent)

2100 Expert Software (Agilent)

Die RNA-Integrität wurde mit dem 2100 Bioanalyzer und dem RNA 6000 Nano Kit der Firma Agilent bestimmt. Auf einem RNA Nano Chip können 12 Proben parallel mittels Kapillarelektrophorese analysiert werden. Eine RNA integrity number (RIN) wird von der Software jeder Probe zugeordnet. Diese wird mit einem standardisierten Algorithmus ermittelt und kann Zahlenwerte zwischen 0 und 10 annehmen. Ein Wert von 10 entspricht RNA von höchster Integrität.

Zur Denaturierung der RNA-Proben wurden je 2 µl der Proben in 1,7 ml Reaktionsgefäße pipettiert, diese bei 70°C für 2 min erhitzt und anschließend direkt auf Eis gekühlt. Vom RNA 6000 Ladder wurden ebenfalls 2 µl bei 70°C für 2 min erhitzt und auf Eis gekühlt. Der RNA 6000 Ladder enthält Fragmente von bekannter Größe. Anhand der Migrationszeit der Ladder-Fragmente kann die Konzentration der untersuchten RNA-Proben ermittelt werden.

Für einen RNA Nano Chip werden 65 µl filtrierte RNA 6000 Gelmatrix benötigt. Es wurden 550 µl Gel auf einen Spin Filter pipettiert und für 10 min bei Raumtemperatur und 1500 g zentrifugiert. Anschließend wurden 65 µl des filtrierten Gels in ein RNase freies microfuge tube (Agilent) pipettiert. Das RNA 6000 dye Konzentrat wurde für 30 min von 4°C auf Raumtemperatur aufgewärmt. Daraufhin wurde es für 10 s mit einem MS2 Minishaker (IKA) gemischt und 1 µl des Konzentrats den 65 µl Gel hinzugefügt. Nach erneuter Mischung mit dem MS2 Minishaker erfolgte eine Zentrifugierung für 10 min bei Raumtemperatur und 13000 g (Centrifuge 5415R, Eppendorf).

Zur Reinigung der Elektroden des 2100 Bioanalyzers wurde einer der Electrode Cleaner Chips mit 350 µl RNaseZAP (Ambion) gefüllt. Dieser verblieb für 1 min im Bioanalyzer bei geschlossenem Deckel. Anschließend wurde der zweite Electrode Cleaner Chip mit 350 µl RNase-freiem Wasser gefüllt. Dieser wurde in den Bioanalyzer gelegt und der Deckel für 10 s geschlossen.

Der RNA 6000 Nano Chip wurde dann in die Chip Priming Station positioniert. 9 µl des Gel-Dye-Mix wurden in das mit einem schwarz hinterlegten G markierte Well des Chips pipettiert. Nach Verschließen der Chip Priming Station wurde der Druckbolzen bis zum Einrasten nach unten gedrückt. Dieser wurde nach 30 s gelöst und nach weiteren 5 s langsam auf die 1 ml Position zurückgezogen. Die beiden übrigen mit G markierten Wells wurden anschließend mit 9 µl Gel-Dye-Mix versehen. In alle 12 Proben-Wells wurden je 5 µl des RNA 6000 Nano Markers pipettiert, der als interner Standard fungiert. In das mit einem Leiter-Symbol markierte Well wurde anschließend ebenfalls 5 µl des RNA 6000 Nano Markers sowie 1 µl des Agilent RNA 6000 Ladder pipettiert. Die 12 Proben

Wells wurden mit je 1 µl einer RNA Probe beladen. Schließlich wurde der Chip im IKA MS3 Chip Vortexer für 1 min bei 2400 rpm gemischt und in den Agilent 6000 Bioanalyzer gelegt. Der Lauf wurde mit der Agilent 2100 Expert Software ausgewertet. Die Software liefert für jede RNA-Probe ein Elektropherogramm (Abbildung 3) und eine Gel-Darstellung (Abbildung 4).

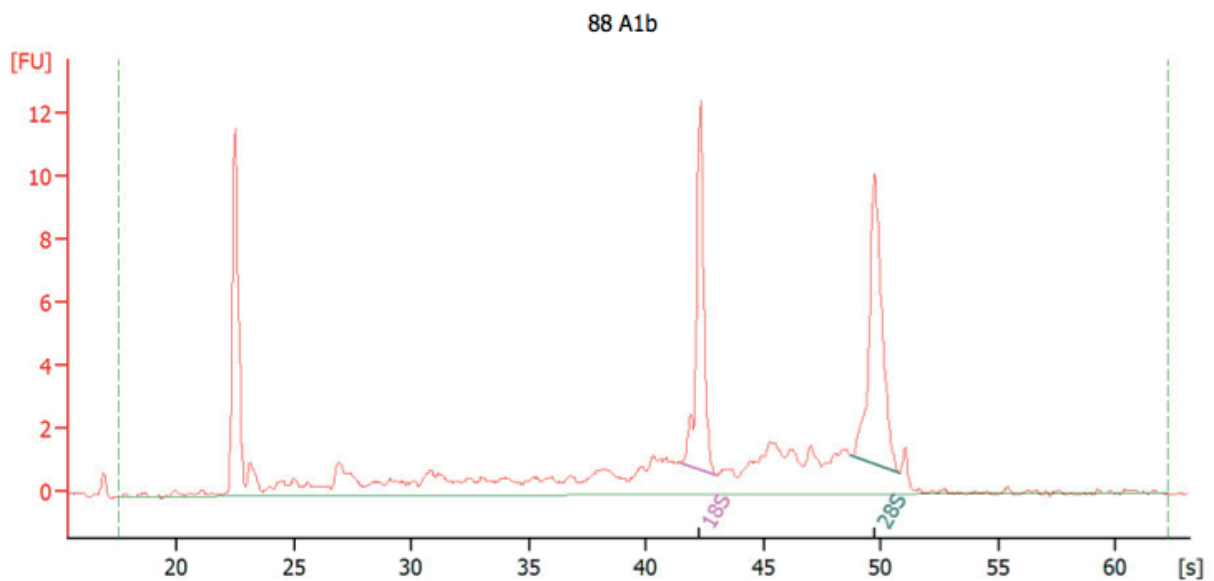


Abbildung 3: Elektropherogramm (2100 Expert Software, Agilent) einer RNA-Probe eines Patienten mit bicuspidaler Aortenklappe ohne Dilatation der Aorta ascendens (BAV-N): Der erste Peak kennzeichnet den Marker, die zwei weiteren die 18 S und 28 S ribosomale RNA. Auf der x-Achse ist die Zeit in Sekunden (s) und auf der y-Achse die Fluoreszenzstärke in Fluoreszenzeinheiten (FU) dargestellt. Die RNA-Konzentration der Probe betrug 30 ng/µl, die RNA Integrity Number (RIN) 7,6.

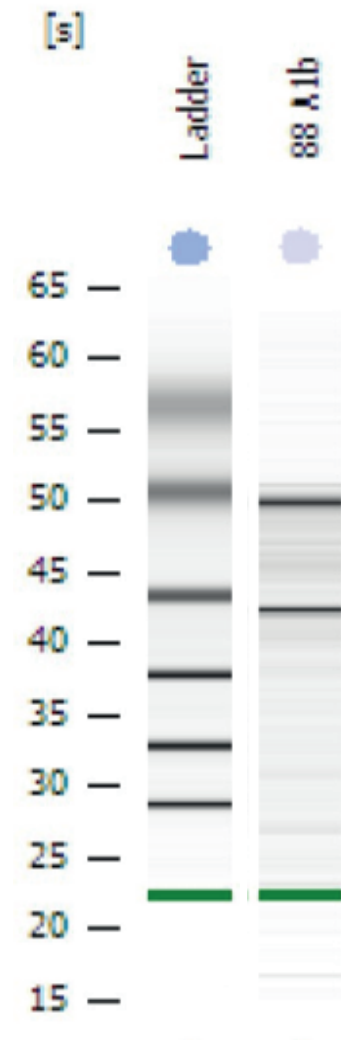


Abbildung 4: Gel-Darstellung (2100 Expert Software, Agilent) des RNA Ladders (links) und einer RNA-Probe eines Patienten mit bicuspidaler Aortenklappe ohne Dilatation der Aorta ascendens (BAV-N, rechts): Die grünen Banden kennzeichnen den Marker, in der rechten Spalte entspricht die obere schwarze Bande der 28 S rRNA und die untere schwarze Bande der 18 S rRNA.

3.5 Synthese der cDNA

Verwendete Reagenzien:

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit # 4368814 (Applied Biosystems)

- 10 x RT Buffer
- 10 RT Random Primers
- 25 x dNTP Mix 100mM
- RNase Inhibitor
- Multiscribe RT

Nuklease-freies Wasser

Verwendete Geräte:

MS2 minishaker (IKA)

GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Alle Schritte der cDNA-Synthese wurden an einem separaten Arbeitsplatz durchgeführt. Die gesamte RNA-Menge der einzelnen Proben wurde für die cDNA-Synthese aufgebraucht. Die verwendeten Reagenzien wurden während des Pipettierens im Eisblock aufbewahrt und einzeln vor der jeweiligen Anwendung auf Eis aufgetaut. Es wurde bei jeder Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ein Leeransatz mitbestimmt. Bei diesem wurde die Menge an RNA durch Nuklease-freies Wasser ersetzt. Der Leeransatz wurde bei der quantitativen PCR zum Ausschluss von Verunreinigungen verwendet.

Zu Beginn der cDNA-Synthese wurde ein Mastermix vorbereitet. Die in dem hier beschriebenen Ansatz aufgeführten Volumina gelten für die cDNA-Synthese aus einer RNA-Probe. Das Gesamtvolumen des Mastermix betrug 10 µl. In ein 1,7 ml Reaktionsgefäß wurden 3,2 µl Nuklease-freies Wasser, 2 µl 10x RT Buffer, 2 µl 10 RT Random Primers und 0,8 µl 25x dNTP Mix 100 mM, 1 µl

RNase Inhibitor sowie 1 µl Multiscribe RT pipettiert und anschließend sorgfältig mit der Pipette vermischt.

Der Mastermix wurde mit einem MS2 Minishaker (IKA) vermischt und in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend wurden 10 µl der RNA-Probe zum Mastermix hinzugefügt. Falls nicht 10 µl der RNA-Probe vorhanden waren, wurde das fehlende Volumen durch Nuklease-freies Wasser ersetzt.

Das 0,2 ml Reaktionsgefäß wurde in den Thermocycler (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) gestellt. Die Phasen der RT-PCR sind in Tabelle 5 dargestellt.

| Phasen | Temperatur (°C) | Zeit (min) |
|----------------------|-----------------|------------|
| Annealing der Primer | 25 | 10 |
| Elongation | 37 | 120 |
| Enzymaktivierung | 85 | 5 |
| Kühlung | 4 | ∞ |

Tabelle 5: Phasen der RT-PCR

3.6 Real-time PCR

Verwendete Reagenzien:

Taqman Gene Expression Master Mix # 94404 (Applied Biosystems)

96-well Custom TaqMan Array Plates (Applied Biosystems)

Nuklease-freies Wasser

Verwendete Geräte und Materialien:

MS 2 Minishaker (IKA)

Centrifuge 5415 R (Eppendorf)

Centrifuge 5430 (Eppendorf)

MicroAmp Adhesive Film (Applied Biosystems)

MicroAmp Adhesive Film Applicator (Applied Biosystems)

StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems)

StepOnePlus Software Version 2.1 (Applied Biosystems)

Für die Real-time PCR (quantitative PCR, qPCR) wurden 96-well TaqMan Custom Plates und TaqMan Gene Expression Assays für die Gene FBN1, GATA5, NOS3, NOTCH1, NOTCH3, COL3A1, MMP19, TGFBR1, TGFBR2, ACTA2 verwendet. Als Referenzgene wurden EIF2B1 (eukaryotic transcription initiation factor 2B, subunit 1), ELF1 (ets-related transcription factor 1) und HMBS (Hydroxymethylbilan-Synthase) benutzt. Die Expression dieser Gene in der Aorta ascendens ist unabhängig von der Morphologie der Aortenklappe und Dilatation der Aorta ascendens, weshalb sie als Referenzgene geeignet sind. Diese Gene wurden in eigenen Experimenten als geeignete Referenzgene etabliert und publiziert [33]. In Tabelle 6 sind die Assay ID-Nummern aller untersuchten Gene dargestellt.

| Gen | TaqMan Assay ID |
|------------|------------------------|
| FBN1 | Hs00171191_m1 |
| TGFBR1 | Hs00610320_m1 |
| TGFBR2 | Hs00234253_m1 |
| NOS3 | Hs01574659_m1 |
| MMP19 | Hs00275699_m1 |
| ACTA2 | Hs00909449_m1 |
| Notch1 | Hs01062014_m1 |
| Notch3 | Hs01128541_m1 |
| GATA5 | Hs00388359_m1 |
| COL3A1 | Hs00943809_m1 |
| ELF1 | Hs00152844_m1 |
| EIF2B1 | Hs00426752_m1 |

| | |
|------|---------------|
| HMBS | Hs00609297_m1 |
|------|---------------|

Tabelle 6: Analysierte Gene mit zugehörigen TaqMan Assay-ID-Nummern

Zwei verschiedene Platten-Schemata wurden erstellt, auf welche die zehn Gene aufgeteilt wurden. Alle drei Referenzgene waren Bestandteile beider Schemata (Abbildungen 5 und 6). Als Referenzgewebe wurde auf jeder Platte eine TAV-N-Probe untersucht. Die Genexpression der anderen Patientengruppen (BAV-D, BAV-N, TAV-D) wurde relativ zur Genexpression der TAV-N Gruppe anhand der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode ermittelt (relative Quantität, RQ) [48].

Das Reaktionsvolumen pro Well betrug 10 μ l, bestehend aus 5 μ l einer Mischung aus cDNA und Nuklease-freiem Wasser und 5 μ l TaqMan Gene Expression Master Mix. Pro Reaktion wurden 20 ng cDNA eingesetzt. Auf jeder 96-well Platte konnten vier Proben untersucht werden, wobei jede Probe als Triplikat analysiert wurde. Das Referenzgen HMBS wurde nur als Duplikat für jede Probe untersucht, da die Wells H1, H4, H7 und H10 auf beiden Platten-Schemata für Leeransätze benutzt wurden. Somit wurden pro 96-Well-Platte insgesamt 23 Wells für eine Probe verwendet.

Zunächst wurde für jede Probe ein Mastermix erstellt. Um eine ausreichende Volumenmenge sicherzustellen, wurde das Volumen des Mastermix für 27 Reaktionen berechnet. Das Gesamtvolumen des Mastermix von 270 μ l setzte sich zusammen aus 135 μ l einer Mischung aus cDNA und Nuklease-freiem Wasser und 135 μ l TaqMan Gene Expression Master Mix. Vor dem Pipettieren wurde das benötigte cDNA-Volumen mit 20 ng cDNA pro Reaktion berechnet. Die erforderliche Menge an Nuklease-freiem Wasser wurde durch die Subtraktion des benötigten cDNA Volumens von 135 μ l ermittelt. Es wurde stets darauf geachtet, dass alle Reagenzien und die cDNA-Proben auf Eis gekühlt wurden. Der TaqMan Gene Expression Master Mix wurde während des Pipettierens vor Licht geschützt. Das Nuklease-freie Wasser, 135 μ l TaqMan Gene Expression Master Mix und das berechnete Volumen der cDNA-Probe

wurden in ein 1,7 ml Reaktionsgefäß pipettiert und kurz mit dem MS 2 Minishaker (IKA) gemischt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugierung bei Raumtemperatur und 1000 g für 1 min (Centrifuge 5415 R, Eppendorf).

[illegible]

Abbildung 5: Platten-Schema 1, untersuchte Gene: FBN1, NOS3, MMP19, TGFB1, TGFB2, ELF1, EIF2B1 und HMBS

[illegible]

Abbildung 6: Platten-Schema 2, untersuchte Gene: ACTA2, NOTCH1, NOTCH3, GATA5, COL3A1, ELF1, EIF2B1 und HMBS

Vor Beginn des Pipettierens wurde die 96-well Custom TaqMan Array Platte bei Raumtemperatur und 1000 g für 1 min zentrifugiert (Centrifuge 5430, Eppendorf). Je 10 µl Mastermix – bestehend aus cDNA, Nuklease-freiem Wasser und TaqMan Gene Expression Master Mix - wurden in die Wells der zugehörigen Probe pipettiert, nachdem die Schutzfolie der Platte entfernt worden war. Anschließend wurden die Leeransätze in die Wells H1, H4, H7 und H10 pipettiert. Der Leeransatz in Well H1 setzte sich zusammen aus 5 µl TaqMan Gene Expression Master Mix und 5 µl Nuklease-freiem Wasser; er diente dem Ausschluss von Verunreinigungen beim Pipettieren der Platten. Die übrigen Leeransätze (Wells H4, H7, H10) wurden zum Ausschluss von RNA-Verunreinigungen während der cDNA-Synthese angefertigt. Diese beinhalteten je 2 µl des Leeransatzes aus der cDNA-Synthese, 3 µl Nuklease-freies Wasser und 5 µl TaqMan Gene Expression Master Mix.

Zuletzt wurde die Platte mit einem MicroAmp Optical Adhesive Film (Applied Biosystems) bedeckt und dieser mit einem MicroAmp Adhesive Film Applicator (Applied Biosystems) versiegelt. Die Platte wurde erneut bei Raumtemperatur und 1000 g für 1 min zentrifugiert (5430 Zentrifuge, Eppendorf) und anschließend in das StepOnePlus Real Time PCR System gestellt. Mit der StepOnePlus Software Version 2.1 wurde der Lauf gestartet.

3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit der Software SPSS Statistics 19 (IBM, Ehningen, Deutschland). Zur Bestimmung eines Zusammenhangs zwischen der Expression der untersuchten zehn Gene und den präoperativ gemessenen vier Durchmessern der Aorta ascendens wurde die Pearson-Produkt-Moment-Korrelation verwendet [10]. Mit dem Student's t-Test bzw. dem Welsh-Test bei inhomogenen Varianzen wurde die Genexpression der zehn Gene zwischen Patienten mit bicuspiden und

tricuspiden Aortenklappen unabhängig von einer Dilatation der Aorta ascendens verglichen [10]. Diese Tests wurden ebenfalls eingesetzt, um Unterschiede in der Genexpression zwischen den beiden Dilatationsmustern (D1 und D2) sowie zwischen Patienten mit unterschiedlichen Fusionstypen der bicuspiden Aortenklappe (BAV R/L, BAV R/A) zu bestimmen. Zur Bestimmung von Unterschieden in der Genexpression zwischen den vier Patientengruppen (BAV-D, TAV-D, BAV-N, TAV-N) wurde eine einfaktorielle ANOVA (analysis of variance, Varianzanalyse) verwendet. Als Post-hoc-Tests dienten der Scheffé- und bei Vorliegen von inhomogenen Varianzen der Games-Howell-Test [10]. Mit einer zweifaktoriellen ANOVA mit den Zwischensubjektfaktoren Aortenklappen-Morphologie und Aortendilatation wurden die Effekte der Morphologie der Aortenklappe sowie der Dilatation der Aorta auf die Genexpression bestimmt. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet [10].

4. Ergebnisse

4.1 eNOS

Unabhängig von der Morphologie der Aortenklappe bestanden keine Korrelationen zwischen der eNOS-Genexpression und den Durchmessern der Aorta ascendens. Bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta ascendens korrelierte der maximale Aortendurchmesser positiv mit der eNOS-Genexpression ($r = 0,65$; $p < 0,05$) (Abbildung i, im Anhang).

Patienten mit bicuspiden Aortenklappen hatten unabhängig vom Vorliegen einer Aortendilatation eine signifikant höhere eNOS-Genexpression in ihrer Aortenwand als Patienten mit tricuspiden Aortenklappen (BAV: $M = 1,66$; $SE = 0,24$; TAV: $M = 1,00$; $SE = 0,13$; $p < 0,05$) (Abbildung 7).

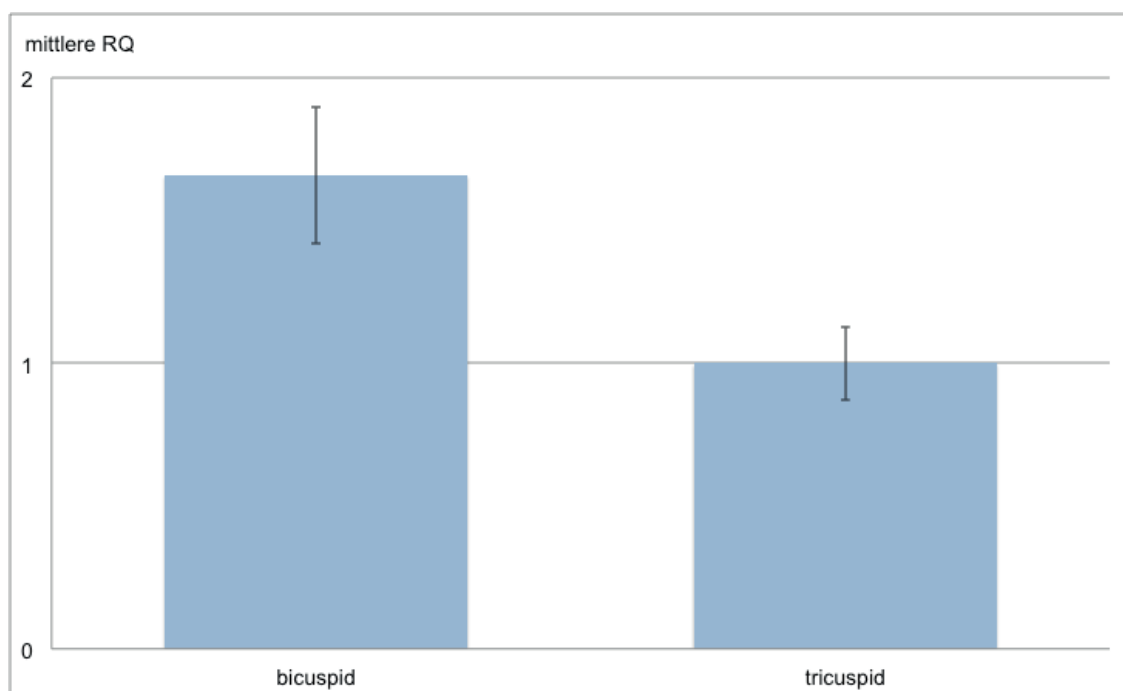


Abbildung 7: eNOS-Genexpression bei Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen. RQ = relative Quantität der qPCR, \pm 1 SE

In der einfaktoriellen ANOVA unterschieden sich die vier Patientengruppen signifikant in ihrer eNOS-Genexpression (BAV-D: $M = 1,43$; $SE = 0,28$; TAV-D: $M = 1,01$; $SE = 0,40$; BAV-N: $M = 2,15$; $SE = 0,42$; TAV-N: $M = 1$; $SE = 0$; $p < 0,05$). In den Post-hoc-Vergleichen konnten allerdings, vermutlich auf Grund der geringen Patientenzahlen, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ermittelt werden. Dennoch gab es einen Trend zu höherer eNOS-Genexpression bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und normal weiter Aorta im Vergleich zu den anderen Patientengruppen (Abbildung 8).

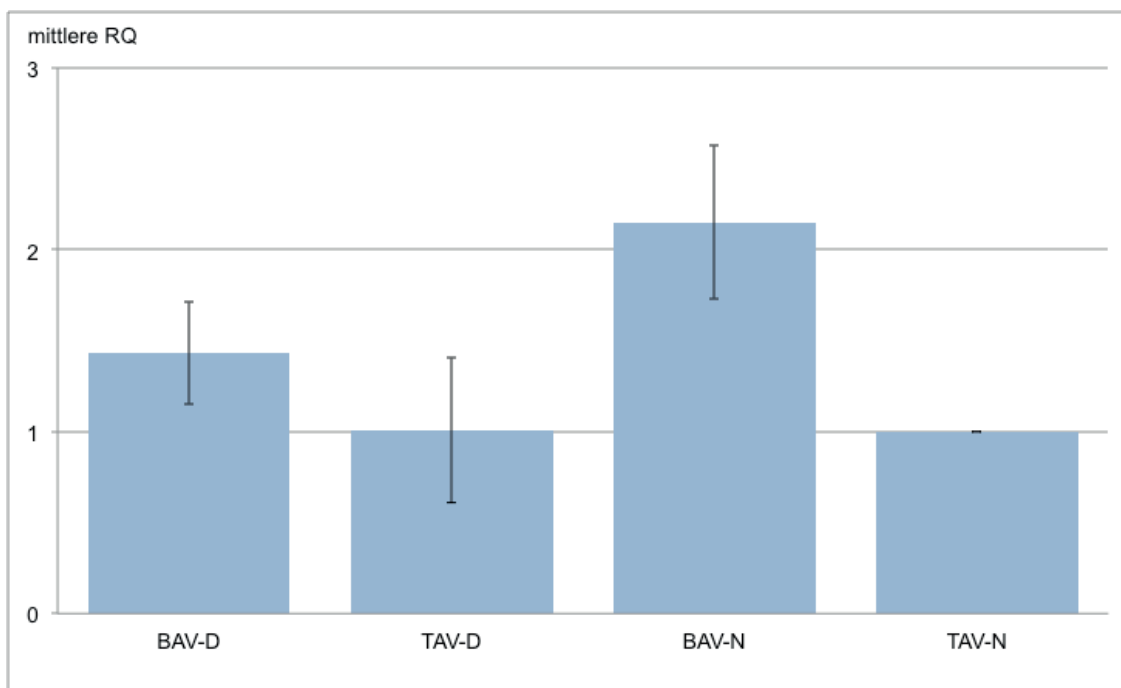


Abbildung 8: eNOS-Genexpression bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta ascendens (BAV-D), tricuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta ascendens (TAV-D), bicuspiden Aortenklappen und normal weiter Aorta ascendens (BAV-N) sowie tricuspiden

Aortenklappen und normal weiter Aorta ascendens (TAV-N). RQ = relative Quantität der qPCR, +/- 1 SE

In der zweifaktoriellen ANOVA hatte die Aortenklappen-Morphologie einen mittelstarken Effekt auf die eNOS-Genexpression ($\eta^2 = 0,12$; $p = 0,01$). Der Faktor Aortendilatation hatte einen kleinen Effekt auf die eNOS-Genexpression ($\eta^2 = 0,03$; $p = 0,21$).

Ein Vergleich der eNOS-Genexpression zwischen den Fusionstypen ergab keinen signifikanten Unterschied (BAV R/L: $M = 1,83$; $SE = 0,28$; BAV R/A: $M = 1,17$; $SE = 0,44$; $p = 0,23$).

Weiterhin lag zwischen den unterschiedlichen Dilatationsmustern der Aorta ascendens kein signifikanter Unterschied in der eNOS-Genexpression vor (D1: $M = 1,48$; $SE = 0,31$; D2: $M = 0,96$; $SE = 0,32$; $p = 0,27$).

4.2 GATA5

Die Genexpression von GATA5 korrelierte unabhängig von der Aortenklappen-Morphologie negativ mit dem aortoventrikulären Durchmesser der Aorta ($r = -0,33$; $p < 0,05$) (Abbildung ii, im Anhang).

Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen unterschieden sich nicht signifikant in ihrer GATA5-Expression (BAV: $M = 1,29$; $SE = 0,24$; TAV: $M = 1,12$; $SE = 0,14$; $p = 0,55$) (Abbildung 9).

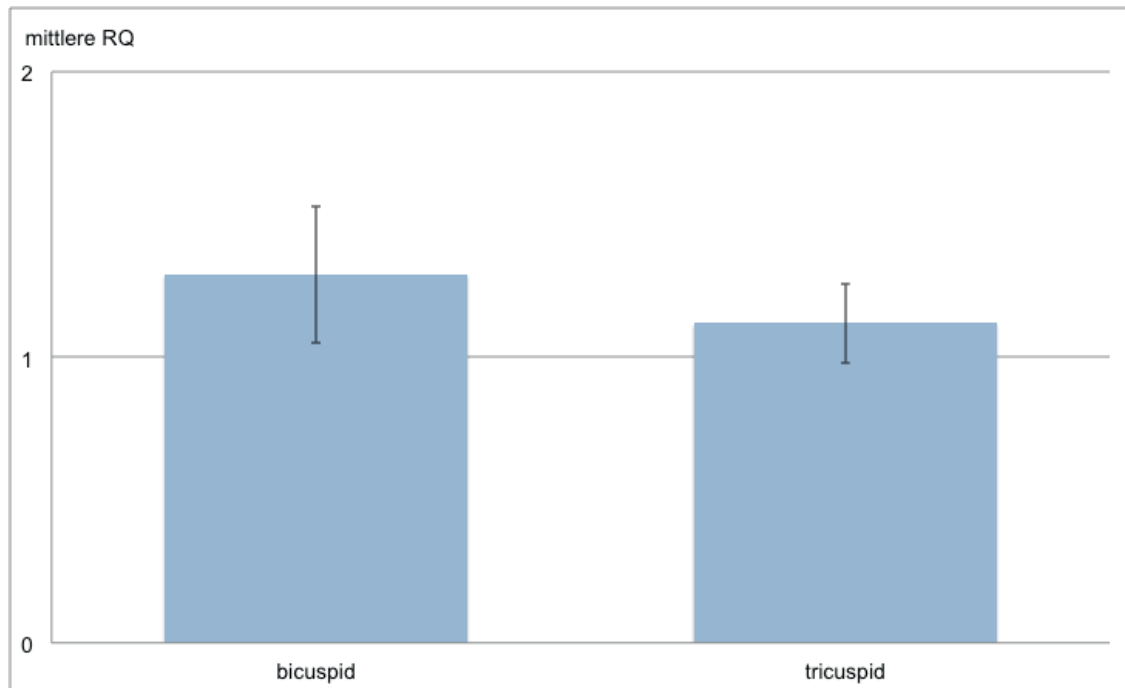


Abbildung 9: GATA5-Genexpression bei Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen. RQ = relative Quantität der qPCR, +/- 1 SE

Auch der Vergleich zwischen den vier Patientengruppen ergab keine signifikanten Unterschiede in der GATA5-Expression (BAV-D: M = 1,05; SE = 0,18; TAV-D: M = 1,38; SE = 0,45; BAV-N: M = 1,80; SE = 0,63; TAV-N: M = 1,00; SE = 0; p = 0,23) (Abbildung 10).

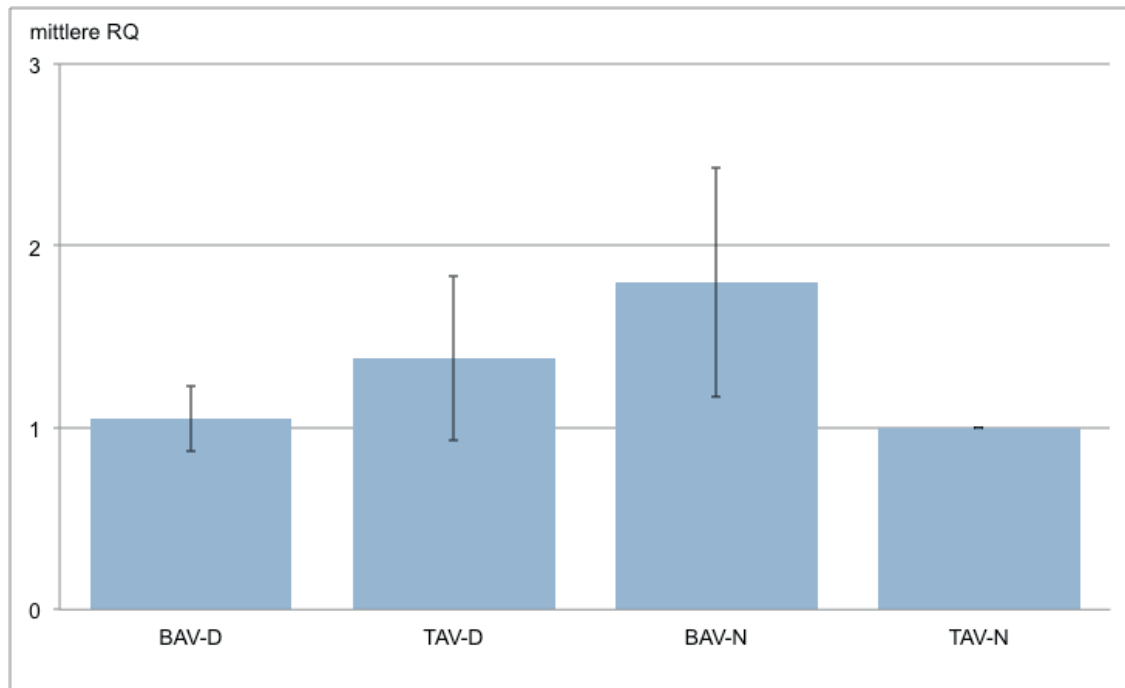


Abbildung 10: GATA5-Genexpression bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta ascendens (BAV-D), tricuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta ascendens (TAV-D), bicuspiden Aortenklappen und normal weiter Aorta ascendens (BAV-N) sowie tricuspiden Aortenklappen und normal weiter Aorta ascendens (TAV-N). RQ = relative Quantität der qPCR, +/- 1 SE

Die zweifaktorielle ANOVA zeigte keinen Effekt der Aortenklappen-Morphologie ($\eta^2 = 0,01$; $p = 0,53$) und einen kleinen Effekt der Aortendilatation ($\eta^2 = 0,11$; $p = 0,43$) auf die GATA5-Genexpression.

Der Vergleich der beiden BAV-Fusionstypen ergab keinen signifikanten Unterschied in der GATA5-Genexpression zwischen Patienten mit unterschiedlichen Fusionstypen der bicuspiden Aortenklappe (BAV R/L: $M = 1,07$; $SE = 0,15$; BAV R/A: $M = 2,05$; $SE = 0,92$; $p = 0,33$).

Auch bei Patienten mit unterschiedlichen Dilatationsmustern der Aorta ascendens lagen keine signifikanten Unterschiede in der GATA5-

Genexpression vor (D1: $M = 1,10$; $SE = 0,24$; D2: $M = 1,27$; $SE = 0,29$; $p = 0,68$).

4.3 NOTCH1

Zwischen den Durchmessern der Aorta ascendens und der NOTCH1-Genexpression lagen unabhängig von der vorliegenden Morphologie der Aortenklappe keine Korrelationen vor. Bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta ascendens bestand eine positive Korrelation zwischen der NOTCH1-Genexpression und dem maximalen Aortendurchmesser ($r = 0,71$; $p < 0,05$) (Abbildung iii, im Anhang) sowie dem Durchmesser auf Höhe der tubulären Aorta ascendens ($r = 0,61$; $p < 0,05$) (Abbildung iv, im Anhang). Im Gegensatz hierzu ließ sich bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen eine negative Korrelation zwischen der NOTCH1-Genexpression und den Durchmessern auf Höhe der tubulären Aorta ascendens ($r = -0,41$, $p < 0,05$) nachweisen (Abbildung v, im Anhang).

Der Vergleich zwischen Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen ergab keine signifikanten Unterschiede in der NOTCH1-Genexpression (BAV: $M = 1,06$; $SE = 0,11$; TAV: $M = 0,94$; $SE = 0,05$; $p = 0,31$) (Abbildung 11).

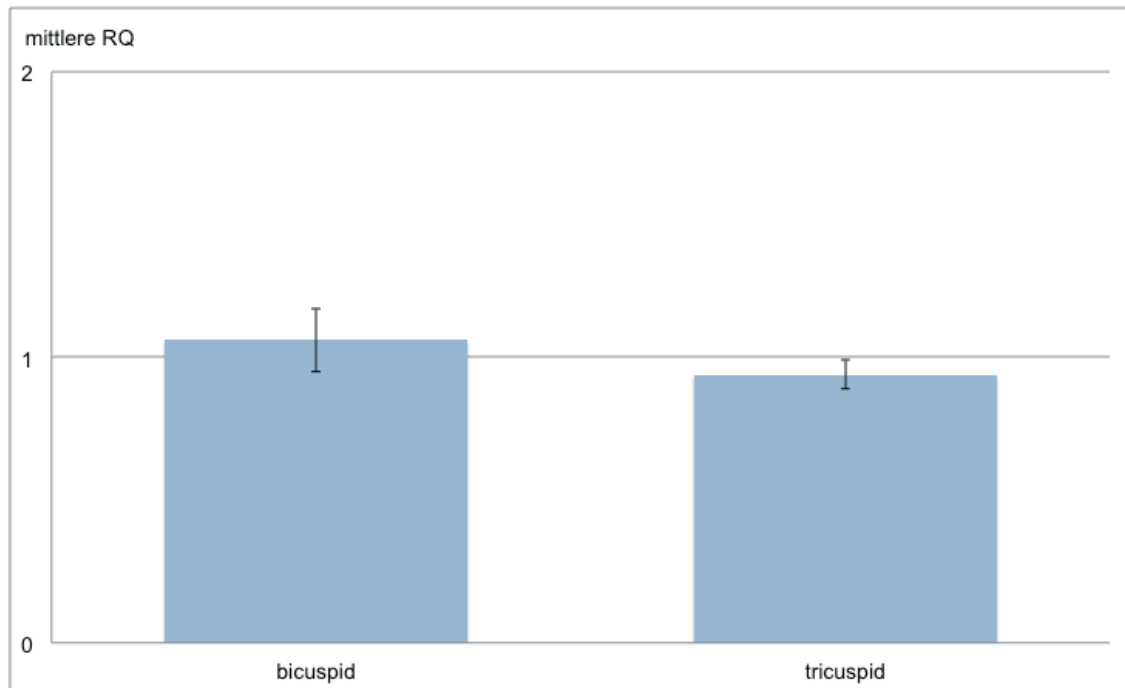


Abbildung 11: NOTCH1-Genexpression bei Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen. RQ = relative Quantität der qPCR, \pm 1 SE

In der einfaktoriellen ANOVA unterschieden sich die vier Patientengruppen nicht signifikant in ihrer NOTCH1-Genexpression (BAV-D: $M = 1,04$; $SE = 0,15$; TAV-D: $M = 0,81$; $SE = 0,13$; BAV-N: $M = 1,11$; $SE = 0,15$; TAV-N: $M = 1$; $SE = 0$; $p = 0,55$) (Abbildung 12).

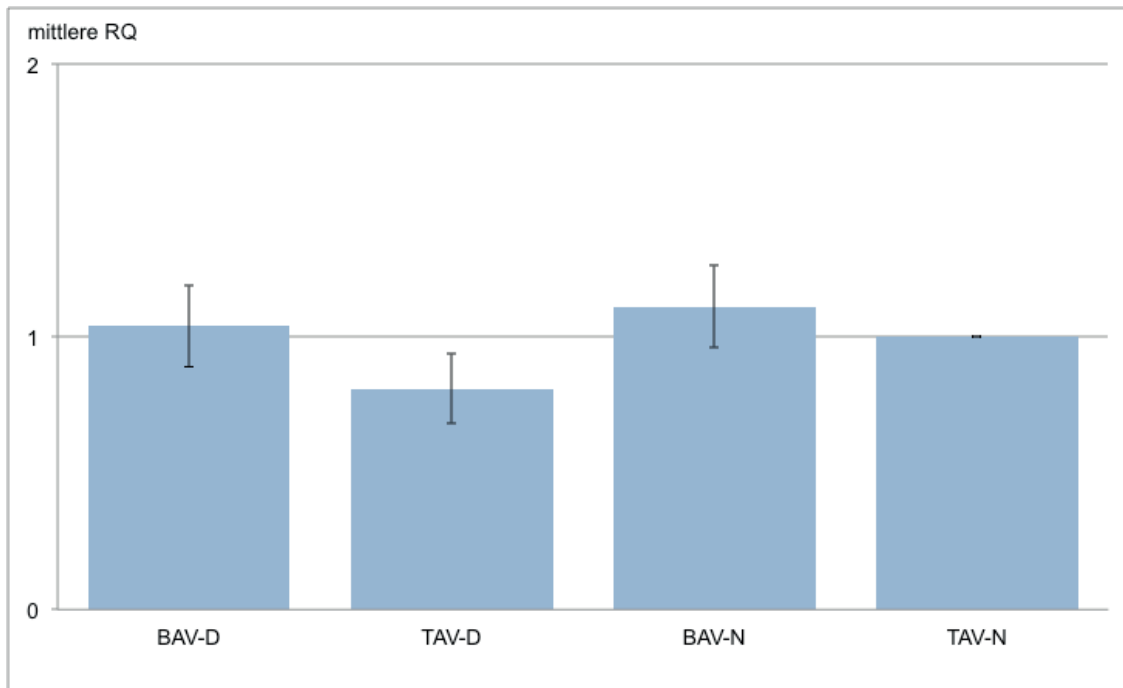


Abbildung 12: NOTCH1-Genexpression bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta ascendens (BAV-D), tricuspiden Aortenklappen und dilaterter Aorta ascendens (TAV-D), bicuspiden Aortenklappen und normal weiter Aorta ascendens (BAV-N) sowie tricuspiden Aortenklappen und normal weiter Aorta ascendens (TAV-N). RQ = relative Quantität der qPCR, +/- 1 SE

In der zweifaktorielle ANOVA hatten die Faktoren Aortenklappen-Morphologie ($\eta^2 = 0,03$; $p = 0,21$) sowie Aortendilatation ($\eta^2 = 0,01$; $p = 0,35$) kleine Effekte auf die NOTCH1-Expression.

Es bestand ein Trend zur höheren NOTCH1-Genexpression bei Patienten mit einer Fusion der rechts- und linkskoronaren Tasche im Vergleich zu Patienten mit einer Fusion der rechts- und akoronaren Tasche (BAV R/L: $M = 1,17$; $SE = 0,14$; BAV R/A: $M = 0,74$; $SE = 0,07$; $p = 0,11$).

Ein Vergleich der NOTCH1-Genexpression zwischen den Dilatationsmustern der Aorta ascendens ergab keinen signifikanten Unterschied (D1: $M = 0,97$; $SE = 0,13$; D2: $M = 0,96$; $SE = 0,21$; $p = 0,97$).

4.4 NOTCH3

Unabhängig von der Morphologie der Aortenklappe bestanden keine Korrelationen zwischen der NOTCH3-Genexpression und den Durchmessern der Aorta ascendens. Nur für die Patientengruppe mit tricuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta ließ sich eine negative Korrelation zwischen der NOTCH3-Genexpression und dem Durchmesser des Sinus Valsalva nachweisen ($r = -0,71$; $p < 0,05$) (Abbildung vi, im Anhang). Im Gegensatz hierzu korrelierte die NOTCH3-Genexpression bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen positiv mit dem aortoventrikulären Durchmesser ($r = 0,38$; $p < 0,05$) (Abbildung vii, im Anhang).

Zwischen Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen bestand kein signifikanter Unterschied in der NOTCH3-Genexpression (BAV: $M = 1,18$; $SE = 0,09$; TAV: $M = 1,21$; $SE = 0,12$; $p = 0,86$) (Abbildung 13).

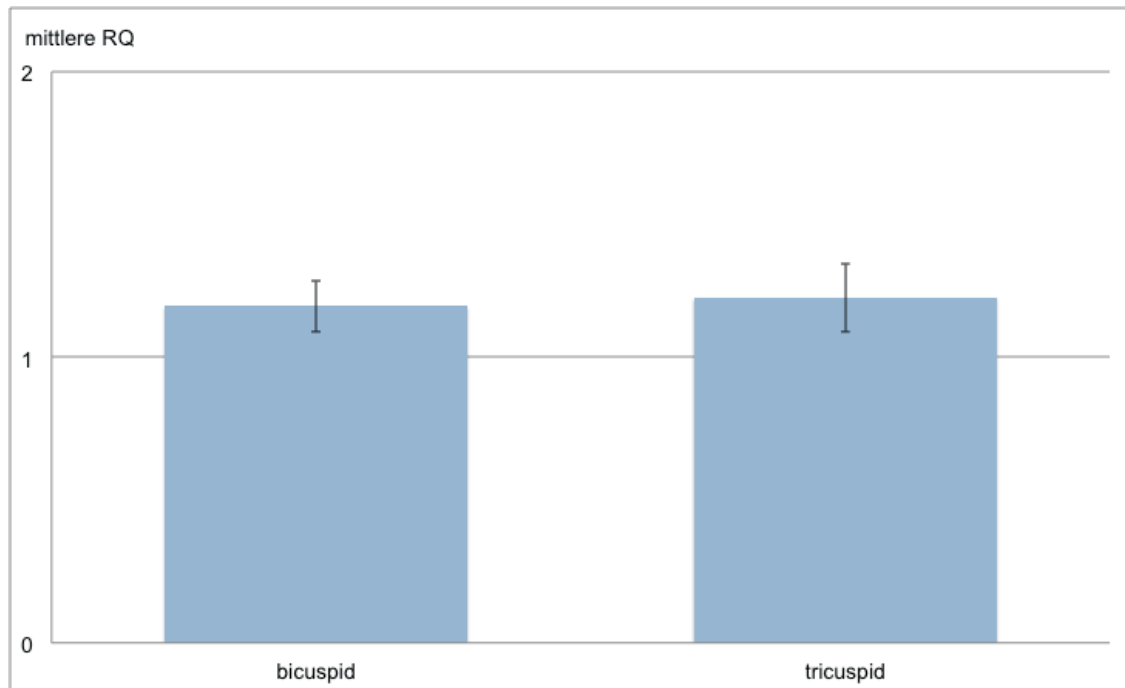


Abbildung 13: NOTCH3-Genexpression bei Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen. RQ = relative Quantität der qPCR, +/- 1 SE

In der einfaktoriellen ANOVA ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen den vier Patientengruppen nachweisen (BAV-D: $M = 1,25$; $SE = 0,12$; TAV-D: $M = 1,60$; $SE = 0,31$; BAV-N: $M = 1,02$; $SE = 0,10$; TAV-N: $M = 1$; $SE = 0$; $p < 0,05$) (Abbildung 14). Die Post-Hoc Tests ergaben allerdings keine signifikanten Unterschiede in der NOTCH3-Genexpression, vermutlich aufgrund der geringen Fallzahl.

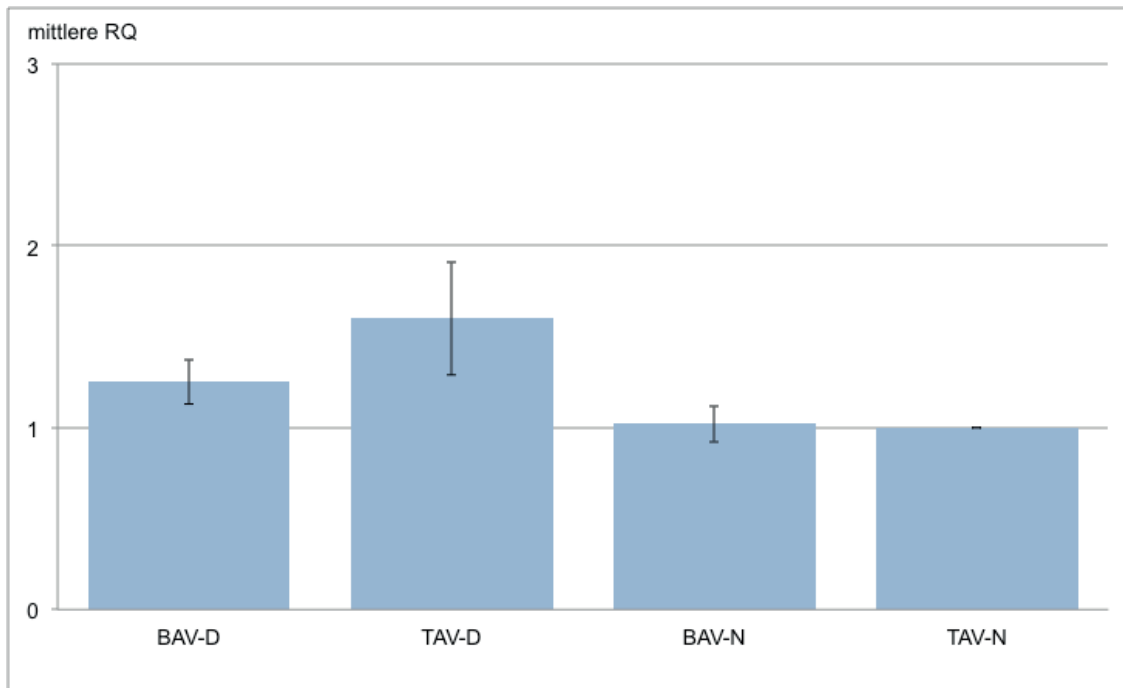


Abbildung 14: NOTCH3-Genexpression bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta ascendens (BAV-D), tricuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta ascendens (TAV-D), bicuspiden Aortenklappen und normal weiter Aorta ascendens (BAV-N) sowie tricuspiden Aortenklappen und normal weiter Aorta ascendens (TAV-N). RQ = relative Quantität der qPCR, +/- 1 SE

Die zweifaktorielle ANOVA ergab für den Faktor Aortendilatation einen mittelstarken Effekt auf die NOTCH3-Genexpression ($\eta^2 = 0,11$; $p = 0,01$). Die Aortenklappen-Morphologie hatte in der zweifaktoriellen ANOVA einen kleinen Effekt auf die NOTCH3-Genexpression ($\eta^2 = 0,02$; $p = 0,27$).

Ein Vergleich der NOTCH3-Genexpression zwischen den beiden Fusionsmustern der bicuspiden Aortenklappe zeigte keine Unterschiede. Es bestand ein Trend zur höheren NOTCH3-Genexpression bei Patienten mit einer Fusion der rechts- und akoronaren Tasche im Vergleich zu Patienten mit einer Fusion der rechts- und linkskoronaren Tasche (BAV R/L: $M = 1,09$; $SE = 0,10$; BAV R/A: $M = 1,46$; $SE = 0,19$; $p = 0,07$).

Auch zwischen den beiden verschiedenen Dilatationsmustern der Aorta ascendens konnte kein signifikanter Unterschied in der NOTCH3-Genexpression nachgewiesen werden (D1: M = 1,32; SE = 0,17; D2: M = 1,43; SE = 0,22; $p = 0,68$).

4.5 FBN1

Die Genexpression von FBN1 korrelierte unabhängig von der Aortenklappen-Morphologie positiv mit dem Durchmesser der Aorta auf Höhe des Sinus Valsalva ($r = 0,31$; $p < 0,05$) (Abbildung viii, im Anhang).

Bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen war die FBN1-Genexpression in der Aortenwand im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen signifikant niedriger (BAV: M = 0,86; SE = 0,04; TAV: M = 1,06; SE = 0,06; $p < 0,01$) (Abbildung 15).

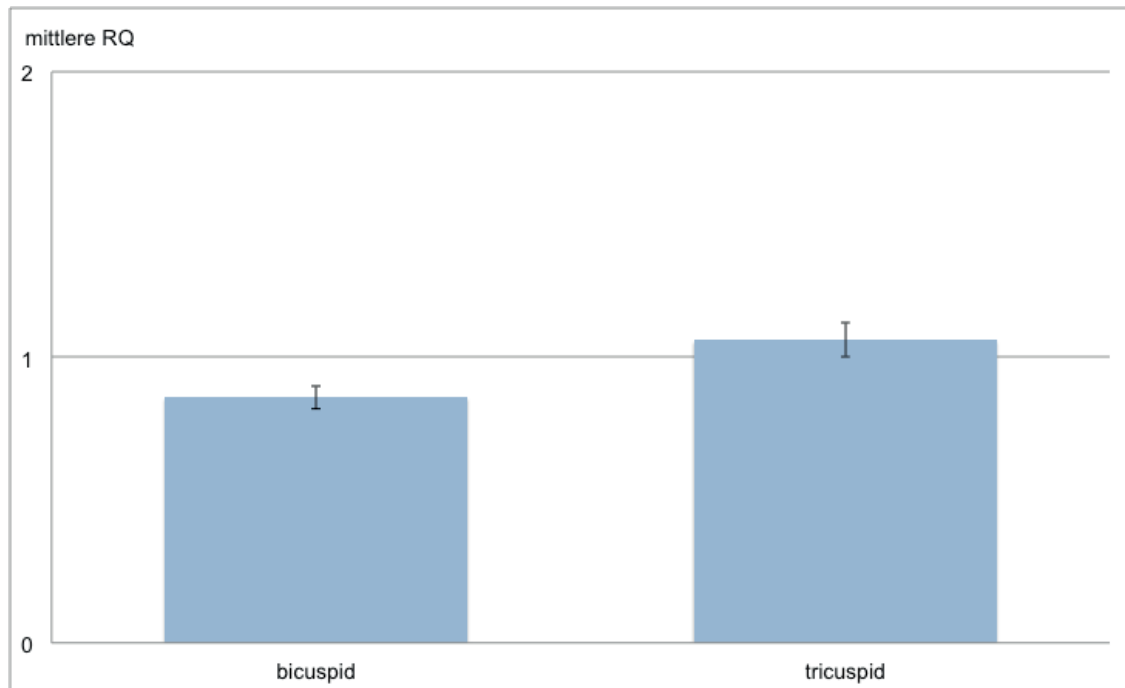


Abbildung 15: FBN1-Genexpression bei Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen. RQ = relative Quantität der qPCR, \pm 1 SE

In der einfaktoriellen ANOVA unterschieden sich die vier Patientengruppen signifikant in ihrer FBN1-Genexpression (BAV-D: $M = 0,86$; $SE = 0,06$; TAV-D: $M = 1,18$; $SE = 0,18$; BAV-N: $M = 0,87$; $SE = 0,05$; TAV-N: $M = 1,0$; $SE = 0$; $p < 0,05$) (Abbildung 16). In den Post-hoc-Vergleichen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

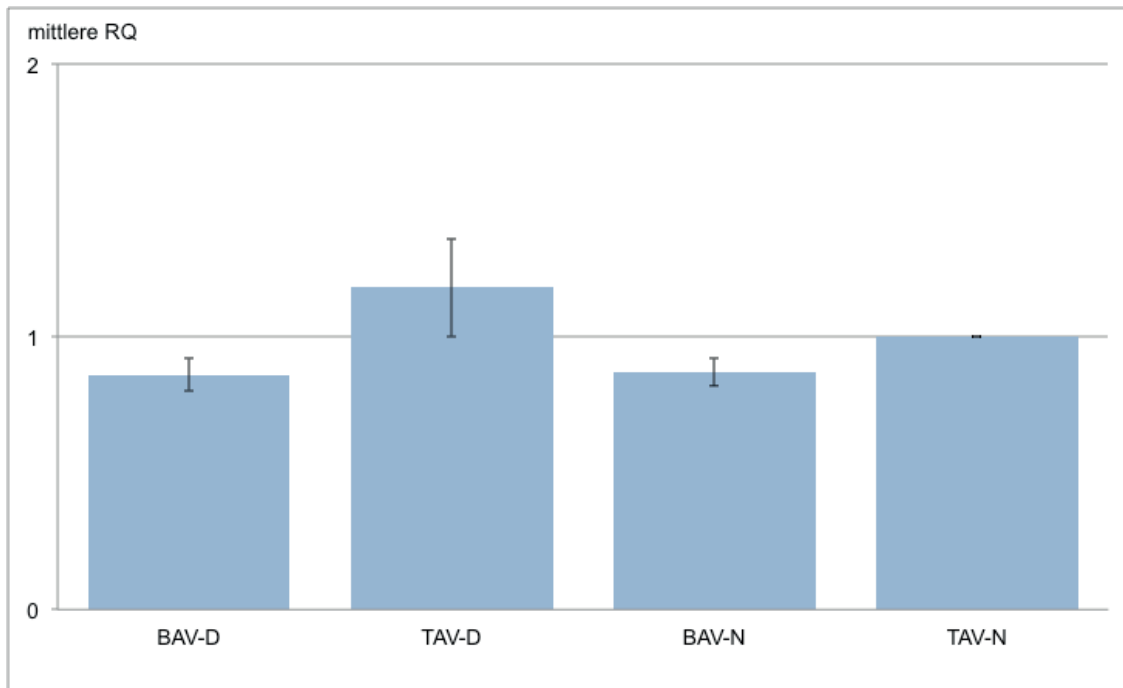


Abbildung 16: FBN1-Genexpression bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta ascendens (BAV-D), tricuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta ascendens (TAV-D), bicuspiden Aortenklappen und normal weiter Aorta ascendens (BAV-N) sowie tricuspiden Aortenklappen und normal weiter Aorta ascendens (TAV-N). RQ = relative Quantität der qPCR, +/- 1 SE

Die zweifaktorielle ANOVA ergab für den Faktor Aortenklappen-Morphologie einen mittelstarken Effekt ($\eta^2 = 0,12$; $p = 0,01$) und für den Faktor Aortendilatation einen kleinen Effekt auf die FBN1-Genexpression ($\eta^2 = 0,02$; $p = 0,29$).

Ein Vergleich der FBN1-Genexpression zwischen den Fusionstypen der bicuspiden Aortenklappe zeigte keinen signifikanten Unterschied (BAV R/L: $M = 0,86$; $SE = 0,05$; BAV R/A: $M = 0,86$; $SE = 0,06$; $p = 1,0$).

Zwischen den Dilatationsmustern der Aorta ascendens konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der FBN1-Genexpression nachgewiesen werden (D1: M = 0,90; SE = 0,05; D2: M = 1,08; SE = 0,18; p = 0,35).

4.6 TGFB1

Zwischen der TGFB1-Genexpression und den Aortendurchmessern konnte keine Korrelation nachgewiesen werden.

Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen unterschieden sich nicht signifikant in ihrer TGFB1-Genexpression (BAV: M = 1,04; SE = 0,11; TAV: M = 0,93; SE = 0,04; p = 0,32) (Abbildung 17).

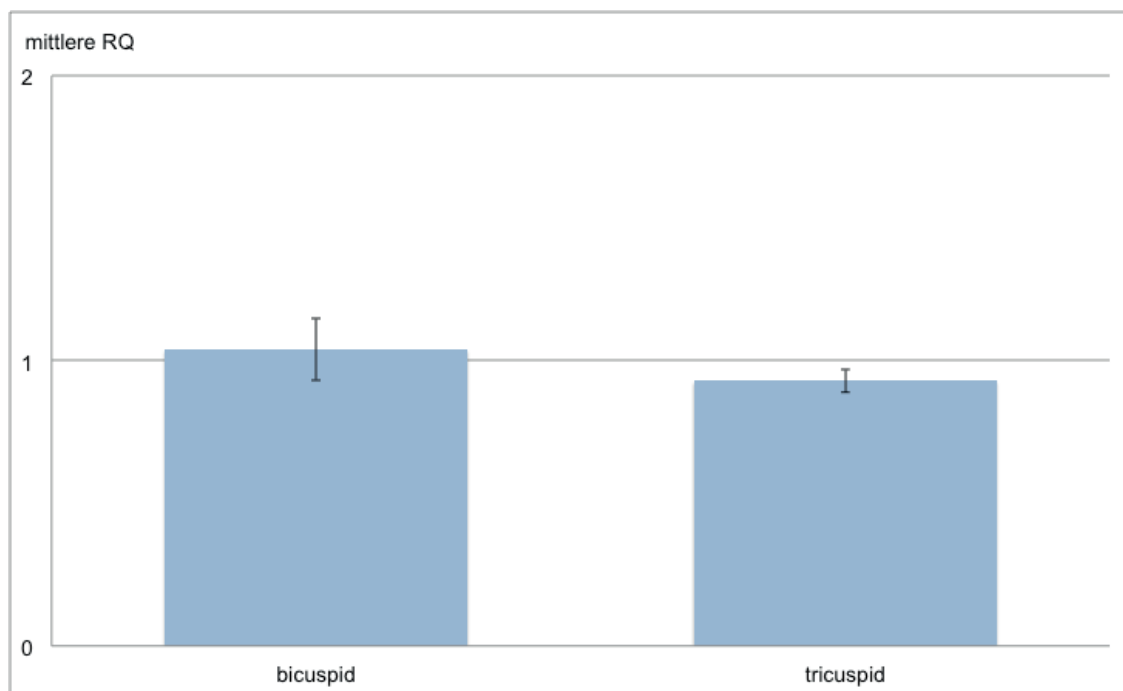


Abbildung 17: TGFB1-Genexpression bei Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen. RQ = relative Quantität der qPCR, +/- 1 SE

Die einfaktorielle ANOVA ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den vier Patientengruppen (BAV-D: $M = 0,91$; $SE = 0,09$; TAV-D: $M = 0,78$; $SE = 0,12$; BAV-N: $M = 1,34$; $SE = 0,27$; TAV-N: $M = 1$; $SE = 0$; $p < 0,05$) (Abbildung 18). In den Post-Hoc-Tests lagen jedoch keine signifikanten Unterschiede vor, was vermutlich auf die geringe Fallzahl zurückzuführen ist.

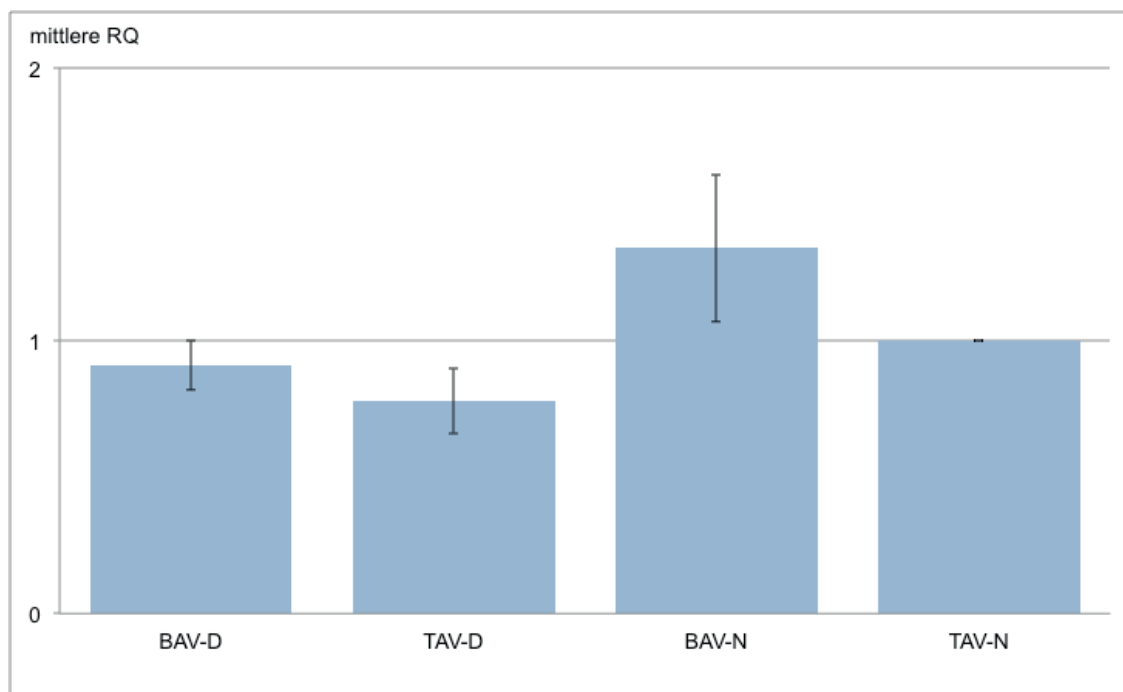


Abbildung 18: TGFB-R1-Genexpression bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta ascendens (BAV-D), tricuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta ascendens (TAV-D), bicuspiden Aortenklappen und normal weiter Aorta ascendens (BAV-N) sowie tricuspiden Aortenklappen und normal weiter Aorta ascendens (TAV-N). RQ = relative Quantität der qPCR, +/- 1 SE

In der zweifaktoriellen ANOVA zeigten die Zwischensubjektfaktoren Aortendilatation ($\eta^2 = 0,11$; $p = 0,01$) und Aortenklappen-Morphologie ($\eta^2 = 0,06$; $p = 0,05$) beide einen mittelstarken Effekt auf die TGFB-R1-Genexpression.

Ein Vergleich der TGFBR1-Genexpression zwischen Patienten mit einer Fusion der rechts- und linkskoronaren Tasche (BAV R/L: $M = 1,03$; $SE = 0,14$) und Patienten einer Fusion der rechts- und akoronaren Tasche (BAV R/A: $M = 1,08$; $SE = 0,12$) ergab keine Unterschiede ($p = 0,84$).

Zwischen Patienten mit unterschiedlichen Dilatationsmustern der Aorta ascendens bestanden signifikante Unterschiede in der Genexpression von TGFBR1. Bei Patienten mit größeren Durchmessern im tubulären Bereich konnte eine höhere TGFBR1-Genexpression im Vergleich zu Patienten mit größeren Durchmessern im Bereich des Sinus Valsalva nachgewiesen werden (D1: $M = 0,98$; $SE = 0,10$; D2: $M = 0,67$; $SE = 0,09$; $p < 0,05$).

4.7 TGFB2

Die TGFB2-Genexpression korrelierte nicht mit den Durchmessern der Aorta ascendens.

Patienten mit bicuspiden Aortenklappen unterschieden sich nicht signifikant in ihrer TGFB2-Genexpression von Patienten mit tricuspiden Aortenklappen (BAV M = 0,87; SE = 0,09; TAV: M = 0,90; SE = 0,04; p = 0,71) (Abbildung 19).

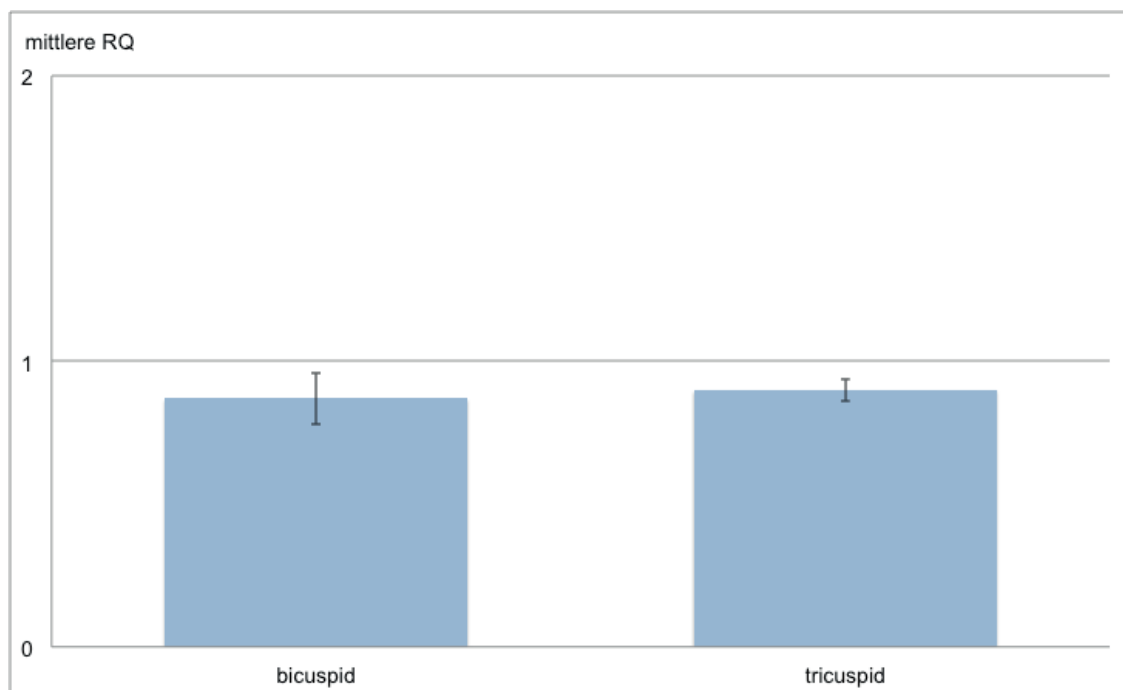


Abbildung 19: TGFB2-Genexpression bei Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen. RQ = relative Quantität der qPCR, +/- 1 SE

In der einfaktoriellen ANOVA ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den vier Patientengruppen nachweisen (BAV-D: $M = 0,78$; $SE = 0,10$; TAV-D: $M = 0,71$; $SE = 0,11$; BAV-N: $M = 1,05$; $SE = 0,18$; TAV-N: $M = 1$; $SE = 0$; $p = 0,06$) (Abbildung 20).

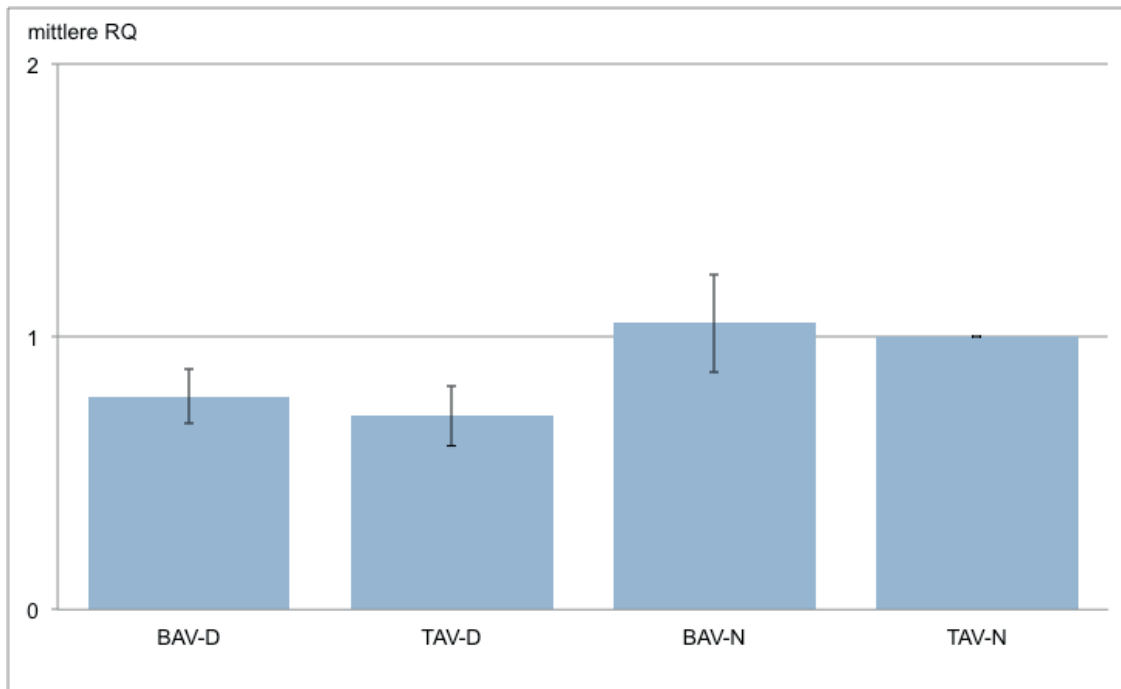


Abbildung 20: TGFBR2-Genexpression bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta ascendens (BAV-D), tricuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta ascendens (TAV-D), bicuspiden Aortenklappen und normal weiter Aorta ascendens (BAV-N) sowie tricuspiden Aortenklappen und normal weiter Aorta ascendens (TAV-N). RQ = relative Quantität der qPCR, ± 1 SE

In der zweifaktoriellen ANOVA mit den Zwischensubjektfaktoren Aortendilatation ($\eta^2 = 0,11$; $p = 0,01$) und Aortenklappen-Morphologie ($\eta^2 = 0,01$; $p = 0,55$) hatte die Aortendilatation einen mittelstarken und die Aortenklappen-Morphologie einen kleinen Effekt auf die TGFBR2-Genexpression.

Die TGFBR2-Genexpression unterschied sich nicht signifikant zwischen den beiden Fusionstypen der bicuspiden Aortenklappe (BAV R/L: $M = 0,93$; $SE = 0,11$; BAV R/A: $M = 0,66$ $SE = 0,16$; $p = 0,19$).

Ein Vergleich der TGFBR2-Genexpression zwischen den beiden Dilatationsmustern der Aorta ascendens ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied. Es bestand ein Trend zur höheren TGFBR2-Genexpression bei Patienten mit einer Dilatation im tubulären Bereich im Vergleich zu Patienten mit einer Dilatation im Bereich des Sinus Valsalva (D1: $M = 0,78$; $SE = 0,09$; D2: $M = 0,72$; $SE = 0,15$; $p = 0,06$).

4.8 COL3A1

Die COL3A1-Genexpression korrelierte nicht mit den Durchmessern der Aorta ascendens.

Es bestanden keine signifikanten Unterschiede in der COL3A1-Expression zwischen Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und Patienten mit tricuspiden Aortenklappen (BAV: $M = 1,14$; $SE = 0,08$; TAV: $M = 1,17$; $SE = 0,09$; $p = 0,79$) (Abbildung 21).

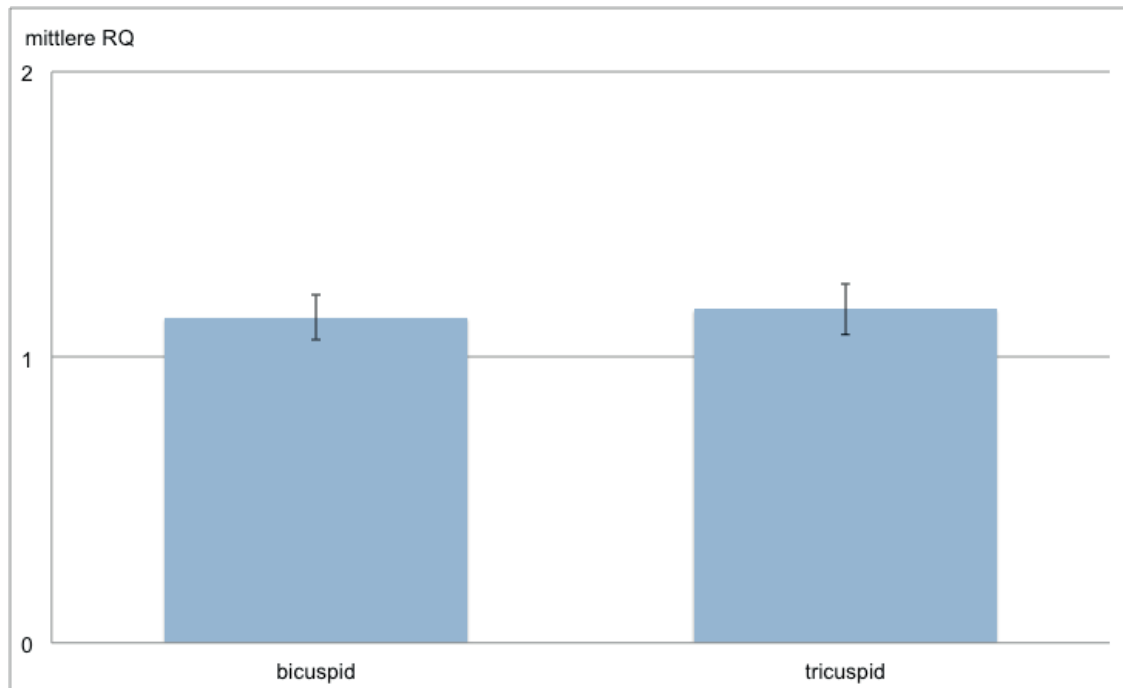


Abbildung 21: COL3A1-Genexpression bei Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen. RQ = relative Quantität der qPCR, \pm 1 SE

In der einfaktoriellen ANOVA ließen sich signifikante Unterschiede in der COL3A1-Genexpression zwischen den vier Patientengruppen nachweisen (BAV-D: $M = 1,20$; $SE = 0,11$; TAV-D: $M = 1,51$; $SE = 0,24$; BAV-N: $M = 1,01$; $SE = 0,10$; TAV-N: $M = 1$; $SE = 0$; $p < 0,05$) (Abbildung 22). Die Post-hoc-Vergleiche ergaben jedoch keine signifikanten Unterschiede, was am ehesten auf die geringe Fallzahl zurückzuführen ist. Bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen gab es einen Trend zu einer höheren COL3A1-Genexpression bei Vorliegen einer Aortendilatation im Vergleich zu normalen Aortendurchmessern.

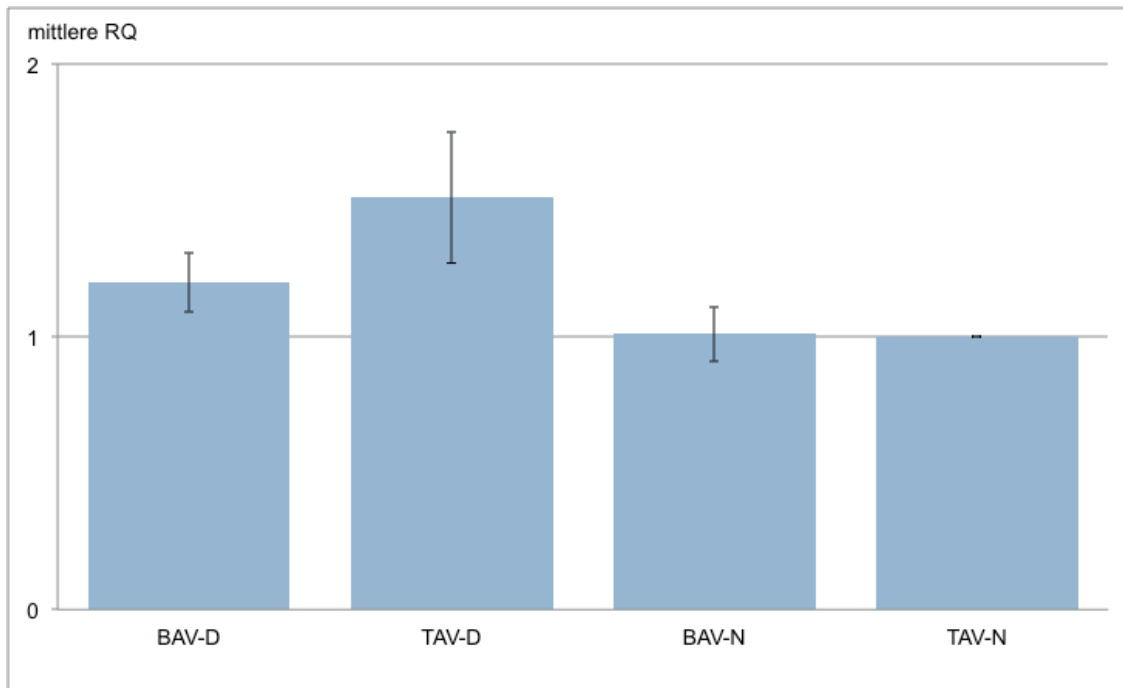


Abbildung 22: COL3A1-Genexpression bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta ascendens (BAV-D), tricuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta ascendens (TAV-D), bicuspiden Aortenklappen und normal weiter Aorta ascendens (BAV-N) sowie tricuspiden Aortenklappen und normal weiter Aorta ascendens (TAV-N). RQ = relative Quantität der qPCR, +/- 1 SE

In der zweifaktoriellen ANOVA mit den Zwischensubjektfaktoren Aortendilatation ($\eta^2 = 0,12$; $p = 0,01$) und Aortenklappen-Morphologie ($\eta^2 = 0,02$; $p = 0,23$) hatte der Faktor Aortendilatation einen mittelstarken und die Aortenklappen-Morphologie einen kleinen Effekt auf die COL3A1-Genexpression.

Es bestand kein signifikanter Unterschied in der COL3A1-Genexpression zwischen den beiden Fusionsmustern der bicuspiden Aortenklappe. Es zeigte sich ein Trend zur höheren COL3A1-Genexpression bei Patienten mit einer Fusion der rechts- und akoronaren Tasche im Vergleich zu Patienten mit einer

Fusion der rechts- und linkskoronaren Tasche. (BAV R/L: $M = 1,05$; $SE = 0,09$; BAV R/A: $M = 1,42$; $SE = 0,18$; $p = 0,06$).

Ein Vergleich der beiden Dilatationsmuster der Aorta ascendens ergab keinen Unterschied in der Expression von COL3A1 (D1: $M = 1,31$; $SE = 0,13$; D2: $M = 1,28$; $SE = 0,19$; $p = 0,87$).

4.9 ACTA2

Die Genexpression von ACTA2 korrelierte unabhängig von der Aortenklappen-Morphologie nicht mit den Durchmessern der Aorta ascendens.

Zwischen Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen bestand kein signifikanter Unterschied in der ACTA2-Genexpression (BAV: $M = 1,07$; $SE = 0,09$; TAV: $M = 0,94$; $SE = 0,05$; $p = 0,21$) (Abbildung 23).

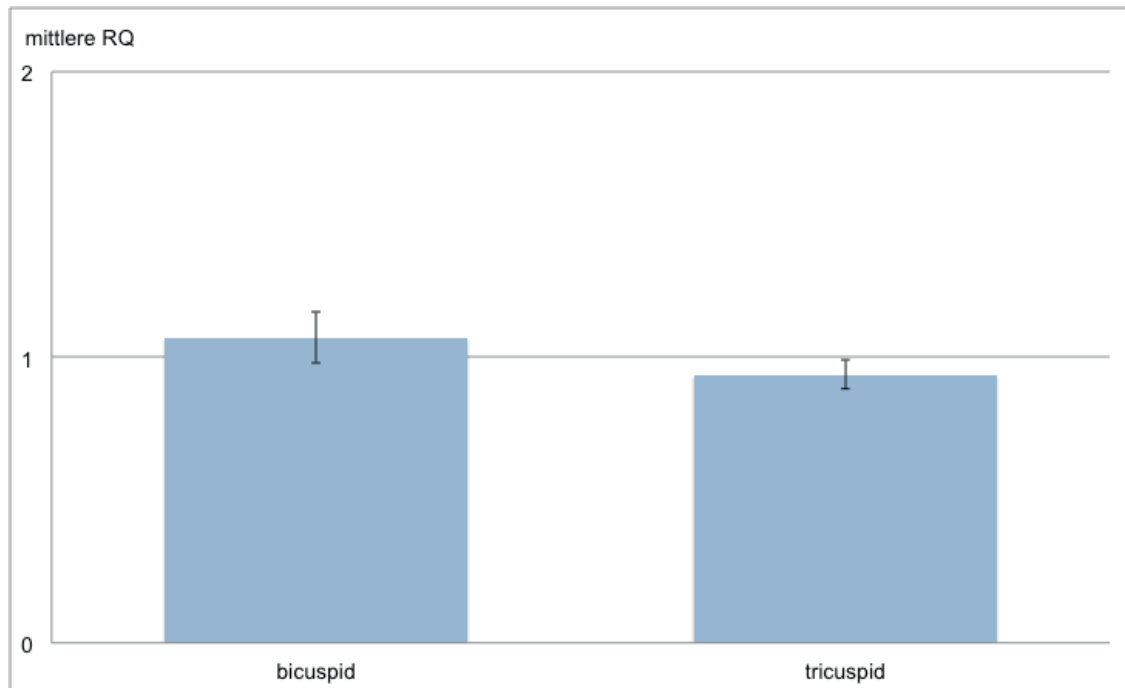


Abbildung 23: ACTA2-Genexpression bei Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen. RQ = relative Quantität der qPCR, +/- 1 SE

Der Vergleich zwischen den vier Patientengruppen ergab in der einfaktoriellen ANOVA ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der ACTA2-Genexpression (BAV-D: M = 1,16; SE = 0,12; TAV-D: M = 0,82; SE = 0,13; BAV-N: M = 0,87; SE = 0,11; TAV-N: M = 1; SE = 0; p = 0,10) (Abbildung 24).

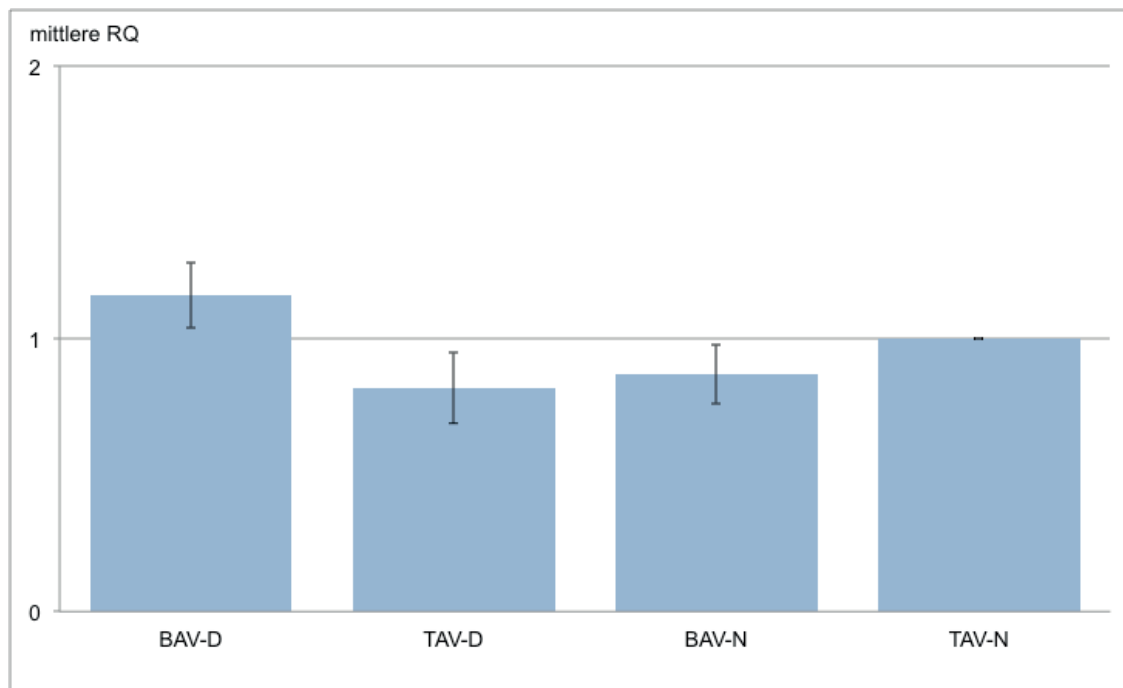


Abbildung 24: ACTA2-Genexpression bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta ascendens (BAV-D), tricuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta ascendens (TAV-D), bicuspiden Aortenklappen und normal weiter Aorta ascendens (BAV-N) sowie tricuspiden Aortenklappen und normal weiter Aorta ascendens (TAV-N). RQ = relative Quantität der qPCR, +/- 1 SE

In der zweifaktoriellen ANOVA hatte der Faktor Aortenklappen-Morphologie einen kleinen Effekt ($\eta^2 = 0,01$; $p = 0,35$) und der Faktor Aortendilatation keinen Effekt ($\eta^2 = 0$; $p = 0,61$) auf die Genexpression von ACTA2.

Zwischen den beiden Fusionstypen der bicuspiden Aortenklappe bestand kein signifikanter Unterschied in der ACTA2-Genexpression (BAV R/L: $M = 1,09$; $SE = 0,10$; BAV R/A: $M = 1,01$; $SE = 0,19$; $p = 0,72$).

Der Vergleich der ACTA2-Genexpression zwischen den beiden Dilatationsmustern der Aorta ascendens ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied (D1: $M = 1,12$; $SE = 0,10$; D2: $M = 0,94$; $SE = 0,18$; $p = 0,39$).

4.10 MMP19

Unabhängig von der Aortenklappen-Morphologie korrelierte die MMP19-Genexpression positiv mit dem Durchmesser der Aorta auf Höhe des aortoventrikulären Übergangs ($r = 0,34$; $p < 0,05$) (Abbildung ix, im Anhang).

Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen unterschieden sich nicht signifikant in ihrer MMP19-Genexpression (BAV: $M = 1,25$; $SE = 0,15$; TAV: $M = 1,04$; $SE = 0,03$; $p = 0,17$) (Abbildung 25).

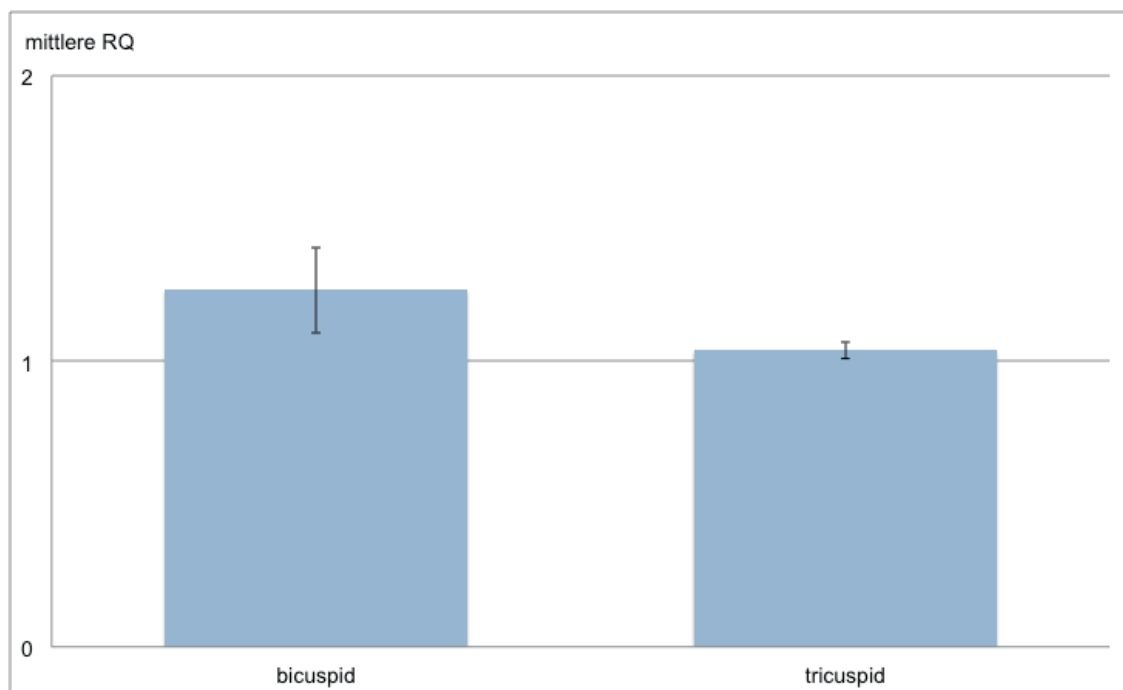


Abbildung 25: MMP19-Genexpression bei Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen. RQ = relative Quantität der qPCR, ± 1 SE

In der einfaktoriellen ANOVA ergab der Vergleich zwischen den vier Patientengruppen keine signifikanten Unterschiede (BAV-D: $M = 1,37$; $SE = 0,20$; TAV-D: $M = 1,12$; $SE = 0,10$; BAV-N: $M = 0,99$; $SE = 0,13$; TAV-N: $M = 1,0$; $SE = 0$; $p = 0,17$) (Abbildung 26)

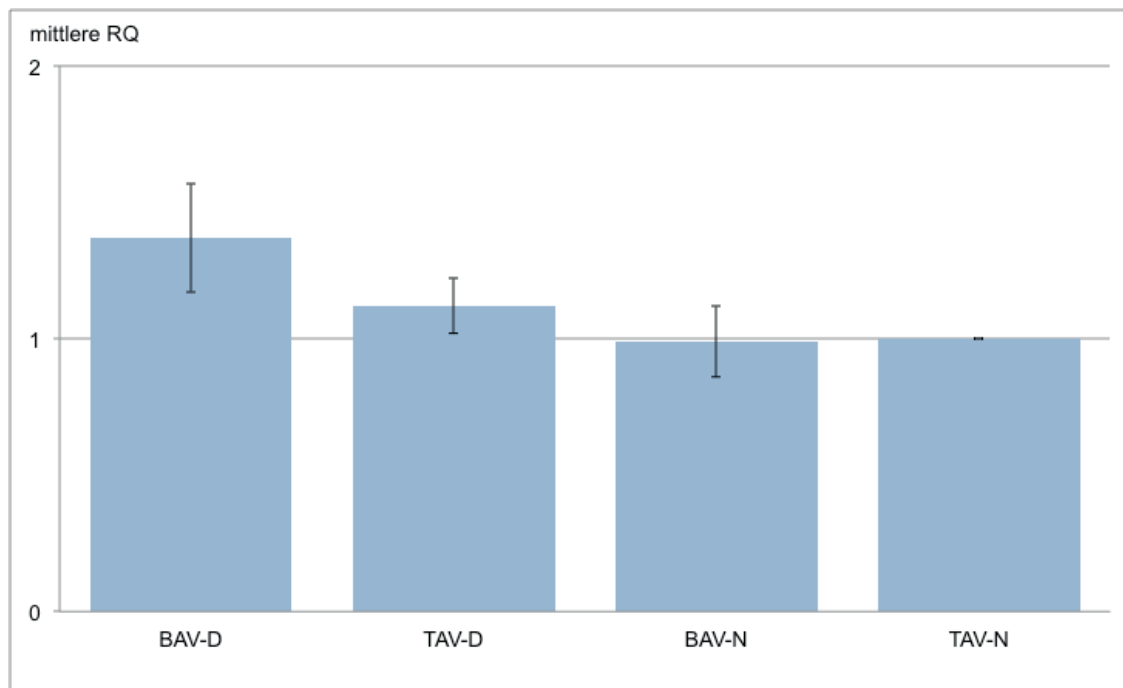


Abbildung 26: MMP19-Genexpression bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta ascendens (BAV-D), tricuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta ascendens (TAV-D), bicuspiden Aortenklappen und normal weiter Aorta ascendens (BAV-N) sowie tricuspiden Aortenklappen und normal weiter Aorta ascendens (TAV-N). RQ = relative Quantität der qPCR, +/- 1 SE

In der zweifaktoriellen ANOVA mit den Zwischensubjektfaktoren Aortenklappen-Morphologie ($\eta^2 = 0,01$; $p = 0,44$) und Aortendilatation ($\eta^2 = 0,01$; $p = 0,42$) zeigten beide Faktoren kleine Effekte auf die MMP19-Genexpression.

Ein Vergleich der MMP19-Genexpression zwischen den Fusionsmustern der Aortenklappe ergab keine signifikanten Unterschiede (BAV R/L: $M = 1,27$; $SE = 0,18$; BAV R/A: $M = 1,19$; $SE = 0,23$; $p = 0,80$).

Die MMP19-Genexpression unterschied sich ebenfalls nicht signifikant zwischen den beiden Dilatationsmustern der Aorta ascendens (D1: $M = 1,26$; $SE = 0,20$; D2: $M = 1,33$; $SE = 0,16$; $p = 0,81$).

5. Diskussion

Etwa 1 % der Allgemeinbevölkerung weist eine bicuspide Aortenklappe auf. Damit ist die bicuspide Aortenklappe die häufigste angeborene kardiale Anomalie [70]. Neben einer Klappendysfunktion entwickelt mehr als die Hälfte der Patienten mit bicuspiden Aortenklappen im Laufe ihres Lebens ein Aneurysma der Aorta ascendens [14].

Da sich Aortenaneurysmen in der Regel symptomlos entwickeln und Symptome meist erst im Rahmen der häufig fatalen Komplikationen wie Aortendissektionen oder -rupturen auftreten [15,72], ist das frühzeitige Erkennen von Risikofaktoren von enormer klinischer Relevanz. Obwohl hämodynamische Faktoren lange als einzige Ursache der Dilatation angesehen wurden, gewinnt in letzter Zeit eine wachsende Zahl an Studien Aufmerksamkeit, die belegen, dass es einen genetisch begründeten Zusammenhang zwischen Aortendilatation und bicuspider Morphologie der Aortenklappe gibt [1,25,60].

Tiefergehendes Wissen über die Pathogenese der Aortendilatation bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen könnte zur Identifikation von Signalkaskaden und Schlüsselfaktoren führen, die gezielt medikamentös beeinflusst werden könnten um das Fortschreiten der Aortendilatation aufzuhalten oder gar diesem vorzubeugen.

5.1 eNOS und GATA5

Sowohl ein Knockout von eNOS als auch von dessen Transkriptionsfaktor GATA5 führt bei Mäusen zu einem gehäuftem Auftreten von bicuspiden Aortenklappen [44,47]. Aicher et al. wiesen eine niedrigere eNOS-Proteinexpression in der Aortenwand von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen nach [1]. Für GATA5 sind ebenfalls beim Menschen Zusammenhänge zur bicuspiden

Aortenklappe beschrieben worden. In zwei Studien wurden nicht-synonyme seltene genetische Varianten im GATA5-Gen bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen entdeckt [8,59]. In Anbetracht dieser Daten ist davon auszugehen, dass eNOS und dessen Transkriptionsfaktor GATA5 eine wesentliche Rolle in der Pathogenese von bicuspiden Aortenklappen spielen.

Auch ein Zusammenhang zwischen eNOS und Aortenaneurysmen ist bereits in einigen Studien beschrieben worden. Kuhlenkordt et al. führten an Mäusen einen eNOS- und apoE-Doppelknockout durch und ernährten die Tiere mit einer cholesterinreichen Diät. Einige dieser Mäuse entwickelten abdominelle Aortenaneurysmen und Aortendissektionen [43]. Aicher et al. wiesen in ihrer Studie einen Zusammenhang zwischen der eNOS-Proteinexpression und thorakalen Aortenaneurysmen bei Menschen nach. Zwischen der eNOS-Proteinexpression und dem sinotubulären sowie dem maximalen Aortendurchmesser bestand bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen eine inverse Korrelation [1].

In der hier vorgelegten Studie sollte untersucht werden, ob die Genexpression von GATA5 und dessen Zielgen eNOS in der Aorta ascendens bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen analog zur eNOS-Proteinexpression verändert ist. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der GATA5-Genexpression zwischen Patienten mit bicuspiden und solchen mit tricuspiden Aortenklappen. Auch ein Vergleich zwischen den vier Patientengruppen (BAV-D, TAV-D, BAV-N, TAV-N) ergab keine signifikanten Unterschiede in der GATA5-Expression. Obwohl ein Zusammenhang zwischen Varianten in GATA5 und bicuspiden Aortenklappen mehrfach in der Literatur beschrieben wurde [8,59], liefern die eigenen Ergebnisse keine Hinweise für eine veränderte GATA5-Expression in der Aortenwand von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen. In einer von unserer Arbeitsgruppe veröffentlichten Studie mit Einbeziehung der hier vorgelegten Daten wurde die Genexpression von GATA5 in der Aortenwand von Patienten mit unicuspiden, bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen untersucht. Bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen war die Expression von GATA5 in der

Aortenwand signifikant höher als bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen [34]. Es mag sein, dass eine erhöhte GATA5-Expression vor allem in der Pathogenese der Aortendilatation bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen eine entscheidende Rolle einnimmt. Bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen scheint dieser Zusammenhang weniger ausgeprägt zu sein.

In der erwähnten Studie unserer Arbeitsgruppe zeigten sich unabhängig von der vorliegenden Morphologie der Aortenklappe negative Korrelationen zwischen der GATA5-Expression und dem maximalen Aortendurchmesser sowie den Diametern der Aorta ascendens auf Höhe des aortoventrikulären Übergangs, des Sinus, des sinotubulären Übergangs und der tubulären Aorta ascendens [34]. Nach den hier vorgelegten Daten besteht unabhängig von der Morphologie der Aortenklappe lediglich eine negative Korrelation zwischen der GATA5-Expression und dem aortoventrikulären Durchmesser der Aorta. Dass die beschriebenen Korrelationen zwischen der GATA5-Expression und den übrigen Diametern der Aorta ascendens hier nicht vorlagen, mag daran liegen, dass in die Studie unserer Arbeitsgruppe auch Patienten mit unicuspiden Aortenklappen einbezogen wurden [34].

Die Genexpression von eNOS in der Aorta ascendens ist nach den eigenen Daten bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen unabhängig vom Vorliegen einer Aortendilatation signifikant höher als bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen. Dieser Unterschied in der eNOS-Genexpression ist genau entgegengesetzt zu der von Aicher et al. beschriebenen verminderten eNOS-Proteinexpression bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen im Vergleich zu solchen mit tricuspiden Aortenklappen. Die Stabilität der eNOS-mRNA wird durch posttranskriptionelle Regulationsmechanismen, an denen unter anderem der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha) beteiligt ist, vermindert [75]. Eine mögliche Erklärung für den reduzierten eNOS-Proteingehalt in der Aortenwand von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen ist, dass posttranskriptionelle Regulationen trotz erhöhter eNOS-mRNA-Expression zu einem erniedrigten Gehalt an eNOS-Protein führen. Ob die hochregulierte eNOS-Expression in der Aortenwand von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen auf eine dysregulierte

GATA5-Aktivität zurückzuführen ist, muss in zukünftigen Studien genauer untersucht werden.

Zwischen der eNOS-Genexpression und den Durchmessern der Aorta ascendens ergab sich unabhängig von der Morphologie der Aortenklappe keine Korrelation. Lediglich bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta ascendens ließ sich eine positive Korrelation zwischen dem maximalen Aortendurchmesser und der eNOS-Genexpression nachweisen. Welche Bedeutung diesem Ergebnis zukommt ist unklar, da die eNOS-Expression in der dilatierten Aortenwand von Patienten mit tricuspiden Aortenklappen vergleichbar hoch war wie in der Kontrollgruppe mit tricuspiden Aortenklappen ohne Aortendilatation.

Bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und normal weiter Aorta (BAV-N) gab es einen Trend zu höherer eNOS-Genexpression im Vergleich zu den anderen Patientengruppen (BAV-D, TAV-D, TAV-N). Dies steht in Einklang mit den Daten von Aicher et al., die eine negative Korrelation zwischen der eNOS-Proteinexpression und dem sinotubulären sowie maximalen Aortendurchmesser bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen beschrieben haben. Es liegt daher nahe, dass eine eNOS-Defizienz nur bei Vorliegen einer bicuspiden Aortenklappe zur Entstehung von Aortenaneurysmen prädisponiert.

5.2 NOTCH1 und NOTCH3

Garg et al. wiesen in zwei Familien mit autosomal-dominant vererbten bicuspiden Aortenklappen Mutationen im NOTCH1-Gen nach [30]. Spätere Studien zeigten, dass auch vereinzelte Fälle von sporadisch auftretenden bicuspiden Aortenklappen mit Mutationen in NOTCH1 assoziiert sind [53,54]. In der hier vorgelegten Studie sollte untersucht werden, ob die NOTCH1-Genexpression in der Aortenwand von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen vermindert ist und ob sich die Genexpression von NOTCH3 analog dazu verhält.

Weder die NOTCH1- noch die NOTCH3-Genexpression in der Aortenwand unterschied sich signifikant zwischen Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen. Damit liegen keine Hinweise darauf vor, dass Veränderungen der Expression der NOTCH-Gene in der Aortenwand ursächlich für eine Aortopathie bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen sein könnten. Diese Daten können allerdings nicht klären, inwiefern die NOTCH-Rezeptoren an der embryologischen Genese einer bicuspiden Morphologie der Aortenklappe beteiligt sind. Da Mutationen in NOTCH1 bisher nur bei einer geringen Subpopulation von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen beschrieben wurden, liegt es nahe, dass die bicuspide Aortenklappe ein heterogenes Krankheitsbild mit unterschiedlichen genetischen Determinanten darstellt. Für den Großteil der sporadisch auftretenden bicuspiden Aortenklappen ist bisher noch keine genetische Ursache aufgedeckt worden.

Eine erhöhte NOTCH3-Expression scheint unabhängig von der Aortenklappen-Morphologie mit dem Vorliegen einer Aortendilatation assoziiert zu sein. In dilatierten thorakalen Aorten konnten Folkersen et al. bei Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen eine hochregulierte NOTCH3-Genexpression nachweisen [28]. In der hier vorgelegten Studie ergab ein Vergleich zwischen den vier Gruppen (BAV-D, TAV-D, BAV-N, TAV-N) signifikante Unterschiede in der NOTCH3-Genexpression, wobei diese bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta am höchsten war. In den Post-hoc-Vergleichen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, was wahrscheinlich auf die geringe Fallzahl zurückzuführen ist. Dennoch wird die Annahme eines Zusammenhangs zwischen einer höheren NOTCH3-Expression und dem Vorliegen einer Aortendilatation in dieser Studie unterstützt. Auch in der zweifaktoriellen ANOVA hatte der Faktor Aortendilatation einen mittelstarken Effekt auf die NOTCH3-Genexpression.

Bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen zeigte sich eine negative Korrelation zwischen der NOTCH3-Expression und dem Sinus-Durchmesser. Hingegen ließ sich bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen eine positive

Korrelation zwischen der NOTCH3-Expression und dem aortoventrikulären Durchmesser nachweisen. Die NOTCH1-Expression korrelierte positiv mit dem maximalen sowie dem Durchmesser auf Höhe der tubulären Aorta ascendens bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen. Auch hier war die Korrelation bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen entgegengesetzt. So korrelierte die NOTCH1-Expression negativ mit dem Durchmesser der tubulären Aorta ascendens bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen. Obwohl die Bedeutung dieser Korrelationen unklar bleibt, deuten sie dennoch auf systematische Unterschiede in den Genexpressionsmustern in der Aortenwand zwischen den beiden Patientengruppen hin. Dass eine dysregulierte Expression der NOTCH-Proteine von zentraler Bedeutung für die Entstehung einer frühzeitigen Aortendilatation bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen ist, erscheint in Anbetracht der Ergebnisse der vorgelegten Studie eher unwahrscheinlich. Dennoch gibt es einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten NOTCH3-Expression und dem Vorliegen einer Aortendilatation, der bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen am stärksten ausgeprägt zu sein scheint. Ob NOTCH3 eine Rolle in der Pathogenese von Aortenaneurysmen bei diesen Patienten zukommt muss in zukünftigen Studien genauer untersucht werden.

Interessanterweise bestanden Unterschiede in der NOTCH1- und NOTCH3-Genexpression zwischen den beiden Fusionstypen der bicuspiden Aortenklappe. Für NOTCH1 gab es einen Trend zur höheren Genexpression bei Patienten mit einer Fusion der rechts- und linkskoronaren Tasche im Vergleich zu Patienten mit einer Fusion der rechts- und akoronaren Tasche. Für die NOTCH3-Genexpression war dieser Trend genau umgekehrt: Patienten mit einer Fusion der rechts- und akoronaren Tasche hatten eine höhere Genexpression in der Aortenwand im Vergleich zu Patienten mit einer Fusion der rechts- und linkskoronaren Tasche. Dass sich Patienten mit unterschiedlichen Fusionstypen der bicuspiden Aortenklappe in ihrer NOTCH-Expression voneinander unterscheiden, ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden. Fernandez et al. wiesen bei 32% ihrer eNOS-Knockout Mäuse bicuspide Aortenklappen nach, die immer rechts-akoronar fusioniert waren [27]. Die eigenen Daten bekräftigen damit auf molekularer Ebene die

Hypothese von Fernandez et al., nach der die beiden Fusionstypen der bicuspiden Aortenklappe unterschiedliche embryologische Entitäten darstellen. Um die hier beschriebenen Unterschiede in der NOTCH1- und NOTCH3-Expression zwischen Patienten mit unterschiedlicher Fusion der bicuspiden Aortenklappe zu überprüfen, sind in Zukunft Studien an größeren Patientenkollektiven notwendig.

5.3 FBN1, TGFB1 und TGFB2

Mutationen in FBN1 liegen dem Marfan-Syndrom zu Grunde, das regelmäßig zum Auftreten von Aortenaneurysmen führt. Auch das Loeys-Dietz-Syndrom, das durch Mutationen in TGFB1 oder TGFB2 verursacht wird, geht mit einem frühen Auftreten von Aortenaneurysmen einher [22,49]. Es gibt Hinweise dafür, dass Veränderungen in den Signalwegen dieser Gene auch eine Rolle in der Entstehung von Aortenaneurysmen bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen unabhängig von diesen Syndromen spielen. In der Literatur ist ein verminderter Fibrillin-1-Proteingehalt in der Aorta ascendens und im Truncus pulmonalis von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen beschrieben worden [25]. Pepe et al. wiesen bei zwei von zehn untersuchten Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und einer Aortendilatation Mutationen im FBN1-Gen nach. Bei diesen Patienten war ein Marfan-Syndrom nach den klinischen Gent-Kriterien ausgeschlossen worden [61]. Forte et al. beschrieben eine verminderte TGFB1-Expression in der Aortenwand von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen. Hingegen war die Expression von TGFB2 in der Aorta ascendens von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen höher als bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen. Dieser Unterschied bestand allerdings nur in der Konkavität der Aorta [29]. Obwohl die genauen Zusammenhänge dieser Einzelbeobachtungen noch nicht eindeutig geklärt sind, ist davon auszugehen, dass der TGF- β -Signalweg die Pathogenese von Aortenaneurysmen bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen beeinflusst.

Ein Ziel der hier vorgelegten Studie war es herauszufinden, ob die Genexpression von FBN1 sowie von TGFB1 und TGFB2 in der Aorta ascendens bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen ohne klinisch diagnostiziertes Marfan- oder Loeys-Dietz-Syndrom im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen vermindert ist. Es konnte eine signifikant niedrigere FBN1-Genexpression in der Aortenwand von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen unabhängig von dem Durchmesser der Aorta ascendens nachgewiesen werden. Weiterhin ergab die zweifaktorielle ANOVA einen mittelstarken Effekt des Faktors Aortenklappen-Morphologie auf die FBN1-Expression.

Somit bestätigen die Daten der hier vorgelegten Studie die von Fedak et al. beschriebenen Unterschiede im Fibrillin1-Proteingehalt in der Aortenwand zwischen Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen auf der Ebene der Genexpression [25]. Der verminderte Fibrillin1-Gehalt in der Aortenwand von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen scheint auf eine reduzierte FBN1-Expression zurückzuführen zu sein. Ob bei einem Teil der hier untersuchten Patienten konstitutionelle Mutationen in FBN1 vorlagen, war kein Gegenstand dieser Studie. Mutationen in FBN1 könnten die Ursache der hier beschriebenen reduzierten FBN1-Expression und damit des reduzierten Fibrillin1-Proteingehalts bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen sein. Das eigene Patientenkollektiv umfasste keine Patienten mit klinisch bzw. molekulargenetisch diagnostiziertem Marfan-Syndrom. Es erscheint aber möglich, dass in einer Subpopulation von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen konstitutionelle FBN1-Mutationen vorliegen könnten, die zwar nicht zum klinischen Vollbild des Marfan-Syndroms führen, aber Ursache der frühzeitigen Aortendilatation sind. Dass die bicuspide Aortenklappe ein genetisch heterogenes Krankheitsbild darstellt, belegen auch die bislang nur in wenigen Familien aufgedeckten NOTCH1-Mutationen [30] sowie die Beobachtung, dass nur etwa 60 % der Patienten mit bicuspiden Aortenklappen Aortenaneurysmen entwickeln [14]. Welcher Stellenwert konstitutionellen

Mutationen in FBN1 in der Pathogenese der Aortendilatation bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen zukommt, ist gegenwärtig noch unklar. Bisher wurden solche Mutationen nur bei zwei von zehn untersuchten Patienten mit bicuspiden Aortenklappen ohne Hinweise auf ein Marfan-Syndrom beschrieben [61]. Die in der hier vorgelegten Studie gezeigte reduzierte FBN1-Expression bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen macht allerdings wahrscheinlich, dass eine fehlregulierte Fibrillin-1-Aktivität ähnlich wie bei Patienten mit Marfan-Syndrom zur Aortopathie dieser Patienten beiträgt.

Ein Vergleich der TGFBR1- und TGFBR2-Expression zwischen Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen ergab keine signifikanten Unterschiede. Somit konnten die Ergebnisse von Forte et al. [29] nicht bestätigt werden. Allerdings wurde die Studie von Forte et al. nur mit Proben von Patienten mit stenosierten bicuspiden Aortenklappen durchgeführt. In der hier vorgelegten Studie lag nur bei 12,5% der Patienten mit bicuspiden Aortenklappen eine isolierte Aortenklappenstenose vor, sodass dies eine mögliche Erklärung für die abweichenden Ergebnisse der beiden Studien sein mag. In zukünftigen Studien sollte daher an einem größeren Patientenkollektiv untersucht werden, ob das vorliegende Aortenklappenvitium einen Einfluss auf die Unterschiede in der TGFBR1- und TGFBR2-Expression zwischen Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen hat.

Interessanterweise wiesen Patienten mit größeren Durchmessern in der tubulären Aorta ascendens (D1) im Vergleich zu Patienten mit einer Dilatation im Bereich des Sinus Valsalva (D2) eine signifikant höhere TGFBR1-Expression auf. Für TGFBR2 konnte ebenfalls ein Trend zur höheren Genexpression im Bereich der tubulären Aorta ascendens (D1) gezeigt werden, jedoch war der Unterschied zu Patienten mit einer Dilatation im Bereich des Sinus (D2) nicht statistisch signifikant. Unabhängig von der vorliegenden Aortenklappen-Morphologie scheinen die Aneurysmen im Bereich der tubulären Aorta ascendens mit einer höheren TGFBR1- und TGFBR2-Expression einherzugehen. Es konnten keine Unterschiede in der TGFBR1- und TGFBR2-Genexpression zwischen den Fusionsmustern der bicuspiden Aortenklappe

festgestellt werden. Hierfür mag allerdings auch die geringe Fallzahl ursächlich sein.

Schaefer et al. und Della Corte et. al. zeigten, dass Patienten mit einer rechts-akoronar fusionierten Aortenklappe vor allem im Bereich der tubulären Aorta ascendens und Patienten mit einer rechts-links fusionierten Aortenklappe im Bereich des Sinus eine Dilatation entwickeln [21,68]. Die abweichenden Dilatationsmuster könnten durch den unterschiedlich gerichteten Jet in der Aorta ascendens bei Patienten mit abweichenden Fusionsmustern der bicuspiden Aortenklappe physikalisch begründet sein [36]. Della Corte et al. spekulieren, dass außerdem eine genetisch bestimmte unterschiedliche Anfälligkeit für hämodynamische Faktoren auf den verschiedenen Ebenen der Aorta ascendens bei den beiden Patientengruppen zur Entstehung der Dilatationsmuster beitragen könnte [21]. Die hier nachgewiesene höhere TGFB β 1-Expression in der Aortenwand bei Vorliegen einer Dilatation der tubulären Aorta ascendens bekräftigt die Hypothese, dass genetische Unterschiede zur Entstehung eines bestimmten Dilatationsmusters beitragen mögen. Es könnte demnach sein, dass die beiden Dilatationsmuster unterschiedliche Entitäten darstellen, die auf einer unterschiedlichen Genexpression in der Aortenwand beruhen.

5.4 COL3A1

Dass eine Störung der Kollagensynthese nicht nur mit syndromalen Aortenaneurysmen (Ehlers-Danlos-Syndrom Typ IV) assoziiert ist [6], sondern auch Einfluss auf die Pathogenese von sporadischen Aortenaneurysmen haben mag, zeigten Wågsäter et al. in einer Studie an Aortengewebe von Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen. Die Autoren beschrieben eine signifikant höhere COL3A1-Expression in der Aorta ascendens bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und einer Aortendilatation im Vergleich zu Patienten mit normalen Durchmessern der Aorta ascendens. In dilatierten

Aorten von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen war die COL3A1-Expression im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen signifikant niedriger [74].

In der hier vorgelegten Studie bestand ebenfalls ein Trend zu einer höheren COL3A1-Expression bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und einer Aortendilatation im Vergleich zu Patienten ohne Dilatation der Aorta ascendens. Dieser Unterschied wurde aber, vermutlich aufgrund der geringen Fallzahl nicht signifikant. Dennoch liefert diese Beobachtung weitere Evidenz dafür, dass bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen eine hohe COL3A1-Expression zu der Entstehung einer Dilatation beiträgt. Hierfür spricht auch der von Wågsäter et al. nachgewiesene höhere Kollagenumsatz in der Aorta ascendens von Patienten mit tricuspiden Aortenklappen bei Vorliegen einer Dilatation [74].

Zwischen Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen konnte kein signifikanter Unterschied in der COL3A1-Expression nachgewiesen werden. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Wågsäter et al. war die Expression von COL3A1 bei Vorliegen einer Aortendilatation höher bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen im Vergleich zu Patienten mit bicuspiden Aortenklappen. Allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant. Dies könnte daran liegen, dass die Fallzahl der hier vorgelegten Studie geringer war als in der Studie von Wågsäter et al (33 vs 69 Patienten mit BAV) [74].

Interessanterweise hat ein Vergleich der COL3A1-Expression zwischen den beiden Fusionstypen der bicuspiden Aortenklappe einen Trend zur höheren COL3A1-Genexpression bei Patienten mit einer Fusion der rechts- und akoronaren Tasche als bei Patienten mit einer Fusion der rechts- und linkskoronaren Tasche ergeben. Bisher gibt es in der Literatur hierzu keine Daten. Aufgrund der geringen Fallzahl wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht, jedoch liefert diese Beobachtung einen weiteren Hinweis dafür, dass die Genexpression in der Aorta ascendens bei den beiden Fusionstypen der bicuspiden Aortenklappe unterschiedlich ist. Studien über die Entwicklung der bicuspiden Aortenklappe deuten bereits darauf hin, dass die Fusionstypen mit

einem unterschiedlichen genetischen Hintergrund einhergehen könnten [27]. Analog zu der in der vorgelegten Studie nachgewiesenen abweichenden Genexpression von NOTCH1 und NOTCH3 bei den beiden Fusionstypen der bicuspiden Aortenklappe mag auch der Expressionsunterschied in COL3A1 auf eine unterschiedliche Pathogenese der Aortenklappenanomalien hinweisen.

5.5 ACTA2

Mutationen in Genen, die für Strukturproteine der glatten Gefäßmuskulatur (ACTA2, MYH11) codieren, sind ursächlich für familiäre thorakale Aortenaneurysmen und Aortendissektionen (FTAAD) [63]. Weiterhin sind Mutationen in ACTA2 auch in wenigen Fällen bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen nachgewiesen worden [32,63]. In einer Studie von Forte et al. wurde bei Patienten mit stenosierte bicuspiden Aortenklappen eine höhere ACTA2-Expression in der Konvexität der Aorta ascendens im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen beschrieben [29].

In der hier vorgelegten Studie konnten die Ergebnisse von Forte et al. nicht bestätigt werden. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied in der ACTA2-Expression zwischen Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen nachweisen. Bei einem Großteil der untersuchten Patienten lag eine Aortenklappeninsuffizienz (75 % der Patienten mit BAV, 70 % der Patienten mit TAV) vor. In der Studie von Forte et al. wurden hingegen nur Patienten mit stenosierte bicuspiden Aortenklappen untersucht. Eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse der hier vorgelegten Studie im Vergleich zu den Ergebnissen von Forte et al. könnte der Einfluss von abweichenden Scherkräften an der Aortenwand bei stenosierte bicuspiden Aortenklappen auf die ACTA2-Genexpression sein. Mahler et al. untersuchten in vitro den Einfluss von laminaren und oszillatorischen Scherkräften auf die Genexpression in Endothelzellen von Schweinen. Sie zeigten, dass die ACTA2-Expression sowohl durch gleichmäßige als auch durch oszillatorische Scherkräfte hochreguliert wird [52]. Es ist daher vorstellbar, dass das vorliegende

Aortenklappenvitium einen Einfluss auf die ACTA2-Expression in der Aortenwand von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen hat. Ob Unterschiede in der ACTA2-Expression zwischen Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen abhängig von dem vorliegenden Aortenklappenvitium sind, muss in weiteren Studien mit größeren Fallzahlen überprüft werden. Zusammenfassend liefert die vorgelegte Studie keine Hinweise auf eine pathogenetische Bedeutung einer veränderten ACTA2-Expression in der Aortendilatation bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen.

5.6 MMP19

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sind wichtige Bestandteile der extrazellulären Matrix, die sowohl in physiologischen als auch pathologischen vaskulären Umbauprozessen eine Rolle spielen. Fehlregulationen in der Aktivität von MMPs sind mit verschiedenen vaskulären Erkrankungen, wie Atherosklerose, abdominalen Aortenaneurysmen und Gefäßverschlüssen der Extremitäten assoziiert [35]. Möglicherweise trägt ein Ungleichgewicht zwischen MMPs und deren Gewebeinhibitoren (tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs) auch zur Entstehung von Aneurysmen der Aorta ascendens bei Patienten mit Aortenklappenanomalien bei. So wurde in der Aortenwand von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen eine mehr als doppelt so hohe Aktivität von MMP2 beschrieben. Auch eine positive Korrelation zwischen der MMP2-Aktivität und dem Aortendurchmesser konnte nur bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen nachgewiesen werden [25]. Jackson et al. wiesen für MMP14 und MMP19 eine erhöhte Expression in der dilatierten Aorta von Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen nach. Bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen korrelierte die MMP19-Expression positiv mit dem maximalen Aortendurchmesser [38].

In der hier vorgelegten Studie korrelierte die MMP19-Expression unabhängig von der Aortenklappen-Morphologie positiv mit dem aortoventrikulären

Durchmesser. Es konnte hingegen keine signifikante Korrelation zwischen der MMP19-Expression und dem maximalen Aortendurchmesser sowie den Durchmessern des Sinus, des sinotubulären Überganges und der tubulären Aorta ascendens nachgewiesen werden. Auch ergab ein Vergleich der MMP19-Expression zwischen Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen unabhängig vom Vorliegen einer Aortendilatation keinen signifikanten Unterschied. Die Ergebnisse der hier vorgelegten Studie geben einen weiteren Hinweis darauf, dass größere Aortendurchmesser – hier nur auf Höhe des aortoventrikulären Übergangs - mit einer höheren MMP19-Expression einhergehen. Eine höhere Genexpression von MMPs scheint unabhängig von der Aortenklappen-Morphologie eine Aneurysmaentstehung zu begünstigen. Auch bislang nur wenig untersuchte Mitglieder der MMP-Familie, wie MMP19, mögen in der Pathogenese von Aneurysmen eine Rolle spielen. Ob eine primäre Dysregulation von MMPs und ihren Gewebeinhibitoren in der Entstehung von thorakalen Aortenaneurysmen vorliegt oder ob die Hochregulation der einzelnen MMPs sekundär durch Veränderungen in vorgeschalteten zellulären Signalwegen verursacht wird, bleibt bislang offen.

5.7 Fazit

Die hier vorgelegte Studie untersuchte vergleichend die Genexpressionsmuster in der Aortenwand von Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen in ihrer Beziehung zur Dilatation der Aorta ascendens. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass spezifische Genexpressionsmuster sowohl in der Embryogenese von kongenitalen Aortenklappenanomalien als auch in der Entwicklung der mit ihnen assoziierten Aortenaneurysmen eine zentrale Rolle spielen.

Bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen ist die Genexpression von eNOS in der Aortenwand signifikant höher als bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen. Verglichen mit den anderen Patientengruppen gibt es bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und normal weiter Aorta ascendens einen Trend zu einer höheren eNOS-Expression in der Aortenwand. Diese Ergebnisse legen die Hypothese nahe, dass eNOS an der Entstehung von Aortenaneurysmen bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen beteiligt ist, wobei eine eNOS-Defizienz nur bei Vorliegen einer bicuspiden Aortenklappe zur Entstehung von Aortenaneurysmen prädisponiert.

Die Genexpression von FBN1 ist in der Aortenwand von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen signifikant erniedrigt. Diese Daten lassen darauf schließen, dass der bekanntermaßen reduzierte Fibrillin-1-Proteingehalt in der Aortenwand von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen aus einer reduzierten Fibrillin-1-Genexpression resultiert. Ob konstitutionelle FBN1-Mutationen, die kürzlich bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen beschrieben wurden, oder Störungen der Genregulation hierfür ursächlich sind, muss in zukünftigen Studien untersucht werden.

Die Genexpression von NOTCH1, NOTCH3 und COL3A1 unterscheidet sich zwischen den beiden Fusionstypen der bicuspiden Aortenklappe. Es gibt einen Trend zur höherer NOTCH3- sowie COL3A1-Expression bei Patienten mit einer

rechts-akoronaren Fusion im Vergleich zu Patienten mit einer rechts-linkskoronaren Fusion. Weiterhin besteht ein Trend zur höheren NOTCH1-Expression bei Vorliegen einer rechts-linkskoronaren Fusion im Vergleich zu einer rechts-akoronaren Fusion. Diese Daten stützen auf molekularer Ebene die Hypothese, dass die beiden Fusionstypen der bicuspiden Aortenklappe eigene Entitäten mit unterschiedlicher Embryogenese darstellen.

Der Vergleich der beiden Dilatationsmuster der Aorta ascendens ergab eine signifikant höhere TGFBR1- und ein Trend zur höheren TGFBR2-Expression bei Patienten mit größeren Durchmessern der tubulären Aorta ascendens (D1) im Vergleich zu Patienten mit einer Dilatation des Sinus Valsalva (D2). Auch dieses Ergebnis bekräftigt die Eingangshypothese, dass Unterschiede in der Genexpression eine wesentliche Rolle in der Entstehung von verschiedenen Dilatationsmustern der Aorta ascendens spielen.

6. Literaturverzeichnis

1. Aicher D, Urbich C, Zeiher A, Dimmeler S, Schäfers HJ (2007) Endothelial nitric oxide synthase in bicuspid aortic valve disease. *Ann Thorac Surg* 83: 1290-1294
2. Aster JC (2014) In brief: Notch signalling in health and disease. *J Pathol* 232: 1-3
3. Basso C, Boschello M, Perrone C, Mecenero A, Cera A, Bicego D, Thiene G, De Dominicis E (2004) An echocardiographic survey of primary school children for bicuspid aortic valve. *Am J Cardiol* 93: 661-663
4. Bauer M, Pasic M, Meyer R, Goetze N, Bauer U, Siniawski H, Hetzer R (2002) Morphometric analysis of aortic media in patients with bicuspid and tricuspid aortic valve. *Ann Thorac Surg* 74: 58-62
5. Bauer M, Siniawski H, Pasic M, Schaumann B, Hetzer R (2006) Different hemodynamic stress of the ascending aorta wall in patients with bicuspid and tricuspid aortic valve. *J Card Surg* 21: 218-220
6. Beighton P, De Paepe A, Steinmann B, Tsipouras P, Wenstrup RJ (1998) Ehlers-Danlos syndromes: revised nosology, Villefranche, 1997. Ehlers-Danlos National Foundation (USA) and Ehlers-Danlos Support Group (UK). *Am J Med Genet* 77: 31-37
7. Beroukhi RS, Kruzick TL, Taylor AL, Gao D, Yetman AT (2006) Progression of aortic dilation in children with a functionally normal bicuspid aortic valve. *Am J Cardiol* 98: 828-830
8. Bonachea EM, Chang SW, Zender G, LaHaye S, Fitzgerald-Butt S, McBride KL, Garg V. (2014) Rare GATA5 sequence variants identified in individuals with bicuspid aortic valve. *Pediatr Res*. 76: 211-216
9. Booher AM, Eagle KA (2011) Diagnosis and management issues in thoracic aortic aneurysm. *Am Heart J* 162: 38-46.e1
10. Bortz, J, Schuster, C (2010) Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler. 7. vollständig überarbeitete und aktualisierte Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
11. Braverman AC, Güven H, Beardslee MA, Maken M, Kates AM, Moon MR (2005) The bicuspid aortic valve. *Curr Probl Cardiol* 30: 470-522
12. Castellano JM, Kovacic JC, Sanz J, Fuster V (2012) Are we ignoring the dilated thoracic aorta? *Ann N Y Acad Sci* 1254:164-174
13. Castonguay MC, Burner KD, Edwards WD, Baddour LM, Maleszewski JJ (2013) Surgical pathology of native valve endocarditis in 310 specimens

from 287 patients (1985-2004). *Cardiovasc Pathol* 22: 19-27

14. Cecconi M, Nistri S, Quarti A, Manfrin M, Colonna PL, Molini E, Perna GP (2006) Aortic dilatation in patients with bicuspid aortic valve. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 7: 11-20
15. Chau KH, Elefteriades JA (2013) Natural history of thoracic aortic aneurysms: size matters, plus moving beyond size. *Prog Cardiovasc Dis* 56: 74-80
16. Chaudhry SS, Cain SA, Morgan A, Dallas SL, Shuttleworth CA, Kielty CM (2007) Fibrillin-1 regulates the bioavailability of TGFbeta1. *J Cell Biol* 176: 355-367
17. Ciotti GR, Vlahos AP, Silverman NH (2006) Morphology and function of the bicuspid aortic valve with and without coarctation of the aorta in the young. *Am J Cardiol* 98: 1096-1102
18. Cury M, Zeidan F, Lobato AC (2013) Aortic disease in the young: genetic aneurysm syndromes, connective tissue disorders, and familial aortic aneurysms and dissections. *Int J Vasc Med* 2013: 267215. doi:10.1155/2013/267215
19. Davies RR, Goldstein LJ, Coady MA, Tittle SL, Rizzo JA, Kopf GS, Elefteriades JA (2002) Yearly rupture or dissection rates for thoracic aortic aneurysms: simple prediction based on size. *Ann Thorac Surg* 73: 17-28
20. de Sa M, Moshkovitz Y, Butany J, David TE (1999) Histologic abnormalities of the ascending aorta and pulmonary trunk in patients with bicuspid aortic valve disease: clinical relevance to the Ross procedure. *J Thorac Cardiovasc Surg* 118: 588-594
21. Della Corte A, Bancone C, Dialetto G, Covino FE, Manduca S, D'Oria V, Petrone G, De Feo M, Nappi G (2014) Towards an individualized approach to bicuspid aortopathy: different valve types have unique determinants of aortic dilatation. *Eur J Cardiothorac Surg*. 45: e118-124
22. Dietz HC, Cutting CR, Pyeritz RE, Maslen CL, Sakai LY, Corson GM, Puffenberger EG, Hamosh A, Nanthakumar EJ, Currustin SM, Stetten G, Meyers DA, Francomano CA (1991) Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature* 352: 337-339
23. El-Hamamsy I, Yacoub MH (2009) Cellular and molecular mechanisms of thoracic aortic aneurysms. *Nat Rev Cardiol* 6: 771-786
24. Elefteriades JA (2008) Thoracic aortic aneurysm: reading the enemy's playbook. *Yale J Biol Med* 81: 175-186
25. Fedak PW, de Sa MP, Verma S, Nili N, Kazemian P, Butany J, Strauss

- BH, Weisel RD, David TE (2003) Vascular matrix remodeling in patients with bicuspid aortic valve malformations: implications for aortic dilatation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 126: 797-806
26. Feng Q, Song W, Lu X, Hamilton JA, Lei M, Peng T, Yee SP (2002) Development of heart failure and congenital septal defects in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 106: 873-879
 27. Fernández B, Durán AC, Fernández-Gallego T, Fernández MC, Such M, Arqué JM, Sans-Coma V (2009) Bicuspid Aortic Valves With Different Spatial Orientations of the Leaflets Are Distinct Etiological Entities. *J Am Coll Cardiol* 54: 2312-2318
 28. Folkersen L, Wågsäter D, Paloschi V, Jackson V, Petrini J, Kurtovic S, Maleki S, Eriksson MJ, Caidahl K, Hamsten A, Michel JB, Liska J, Gabrielsen A, Franco-Cereceda A, Eriksson P (2011) Unraveling divergent gene expression profiles in bicuspid and tricuspid aortic valve patients with thoracic aortic dilatation: the ASAP study. *Mol Med* 17: 1365-1373
 29. Forte A, Corte Della A, Grossi M, Bancone C, Provenzano R, Finicelli M, De Feo M, De Santo LS, Nappi G, Cotrufo M, Galderisi U, Cipollaro M (2013) Early cell changes and TGF β pathway alterations in the aortopathy associated with bicuspid aortic valve stenosis. *Clin Sci (Lond)* 124: 97-108
 30. Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN, Grossfeld PD, Srivastava D (2005) Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature* 437: 270-274
 31. Godon P, Bonnefoy E, Desjeux G, Touboul P (2001) Early risk factors in acute type A aortic dissection: is there a predictor of preoperative mortality? *J Cardiovasc Surg (Torino)* 42: 647-650.
 32. Guo DC, Pannu H, Tran-Fadulu V, Papke CL, Yu RK, Avidan N, Bourgeois S, Estrera AL, Safi HJ, Sparks E, Amor D, Ades L, McConnell V, Willoughby CE, Abuelo D, Willing M, Lewis RA, Kim DH, Scherer S, Tung PP, Ahn C, Buja LM, Raman CS, Shete SS, Milewicz DM (2007) Mutations in smooth muscle alpha-actin (ACTA2) lead to thoracic aortic aneurysms and dissections. *Nat Genet* 39: 1488-1493
 33. Henn D, Bandner-Risch D, Perttunen H, Schmied W, Porras C, Ceballos F, Rodriguez-Losada N, Schäfers HJ (2013) Identification of reference genes for quantitative rt-PCR in ascending aortic aneurysms. *PLoS ONE* 8: e54132. doi: 10.1371/journal.pone.0054132.
 34. Henn D, Perttunen H, Gauer S, Schmied W, Porras C, Such M, Schäfers HJ (2014) GATA5 and endothelial nitric oxide synthase expression in the ascending aorta is related to aortic size and valve morphology. *Ann Thorac Surg* 97: 2019-2025

35. Hobeika MJ, Thompson RW, Muhs BE, Brooks PC, Gagne PJ (2007) Matrix metalloproteinases in peripheral vascular disease. *J Vasc Surg* 45: 849-857
36. Hope MD, Hope TA, Meadows AK, Ordovas KG, Urbania TH, Alley MT, Higgins CB (2010) Bicuspid aortic valve: four-dimensional mr evaluation of ascending aortic systolic flow patterns. *255: 53-61*
37. Isselbacher EM (2005) Thoracic and abdominal aortic aneurysms. *Circulation* 111:816-828
38. Jackson V, Olsson T, Kurtovic S, Folkersen L, Paloschi V, Wågsäter D, Franco-Cereceda A, Eriksson P (2012) Matrix metalloproteinase 14 and 19 expression is associated with thoracic aortic aneurysms. *J Thorac Cardiovasc Surg* 144: 459-466
39. Jackson V, Petrini J, Caidahl K, Eriksson MJ, Liska J, Eriksson P, Franco-Cereceda A (2011) Bicuspid aortic valve leaflet morphology in relation to aortic root morphology: a study of 300 patients undergoing open-heart surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 40: e118-e124
40. Johansson G, Markström U, Swedenborg J (1995) Ruptured thoracic aortic aneurysms: A study of incidence and mortality rates. *J Vasc Surg* 21: 985-988
41. Joint Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC), European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) (2012) Guidelines on the management of vascular heart disease. *Eur Heart J* 33: 2451-2496
42. Kawahito K, Adachi H, Yamaguchi A, Ino T (2001) Preoperative risk factors for hospital mortality in acute type A aortic dissection. *Ann Thorac Surg* 71: 1239-1243
43. Kuhlencordt PJ, Gyurko R, Han F, Scherrer-Crosbie M, Aretz TH, Hajjar R, Picard MH, Huang PL (2001) Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. *Circulation* 104: 448-454
44. Laforest B, Andelfinger G, Nemer M (2011) Loss of Gata5 in mice leads to bicuspid aortic valve. *J Clin Invest* 121: 2876-2887
45. Larson EW, Edwards WD (1984) Risk factors for aortic dissection: a necropsy study of 161 cases. *Am J Cardiol* 53: 849-855
46. Lavall D, Schäfers HJ, Böhm M, Laufs U (2012) Aneurysms of the ascending aorta. *Dtsch Arztebl Int* 109: 227-233
47. Lee TC, Zhao YD, Courtman DW, Stewart DJ (2000) Abnormal aortic valve development in mice lacking endothelial nitric oxide synthase.

Circulation 101: 2345-2348

48. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408
49. Loeys BL, Chen J, Neptune ER, Judge DP, Podowski M, Holm T, Meyers J, Leitch CC, Katsanis N, Sharifi N, Xu FL, Myers LA, Spevak PJ, Cameron DE, De Backer J, Hellemans J, Chen Y, Davis EC, Webb CL, Kress W, Coucke P, Rifkin DB, De Paepe AM, Dietz HC (2005) A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat Genet* 37: 275-281
50. Loeys BL, Dietz HC, Braverman AC, Callewaert BL, De Backer J, Devereux RB, Hilhorst-Hofstee Y, Jondeau G, Faivre L, Milewicz DM, Pyeritz RE, Sponseller PD, Wordsworth P, De Paepe AM (2010) The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome. *J Med Genet* 47: 476-485
51. Loeys BL, Schwarze U, Holm T, Callewaert BL, Thomas GH, Pannu H, De Backer JF, Oswald GL, Symoens S, Manouvrier S, Roberts AE, Faravelli F, Greco MA, Pyeritz RE, Milewicz DM, Coucke PJ, Cameron DE, Braverman AC, Byers PH, De Paepe AM, Dietz HC (2006) Aneurysm syndromes caused by mutations in the TGF-beta receptor. *N Engl J Med*. 355:788-798
52. Mahler GJ, Frendl CM, Cao Q, Butcher JT (2014) Effects of shear stress pattern and magnitude on mesenchymal transformation and invasion of aortic valve endothelial cells. *Biotechnol Bioeng*. 111: 2326-2337
53. McKellar SH, Tester DJ, Yagubyan M, Majumdar R, Ackerman MJ, Sundt TM 3rd (2007) Novel NOTCH1 mutations in patients with bicuspid aortic valve disease and thoracic aortic aneurysms. *J Thorac Cardiovasc Surg* 134: 290-296
54. Mohamed SA, Aherrahrou Z, Liptau H, Erasmi AW, Hagemann C, Wrobel S, Borzym K, Schunkert H, Sievers HH, Erdmann J (2006) Novel missense mutations (p.T596M and p.P1797H) in NOTCH1 in patients with bicuspid aortic valve. *Biochem Biophys Res Commun* 345: 1460-1465
55. Nagase H, Woessner JF Jr. (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274: 21491-21494
56. Niwa K, Perloff JK, Bhuta SM, Laks H, Drinkwater DC, Child JS, Minder PD (2001) Structural abnormalities of great arterial walls in congenital heart disease: light and electron microscopic analyses. *Circulation* 103: 393-400
57. Novaro GM, Mishra M, Griffin BP (2003) Incidence and echocardiographic features of congenital unicuspid aortic valve in an adult population. *J*

Heart Valve Dis 12: 674-678

58. Olsson C, Thelin S, Ståhle E, Ekbom A, Granath F (2006) Thoracic aortic aneurysm and dissection: increasing prevalence and improved outcomes reported in a nationwide population-based study of more than 14,000 cases from 1987 to 2002. *Circulation* 114: 2611-2618
59. Padang R, Bagnall RD, Richmond DR, Bannon PG, Semsarian C (2012) Rare non-synonymous variations in the transcriptional activation domains of GATA5 in bicuspid aortic valve disease. *J Mol Cell Cardiol* 53: 277-281
60. Padang R, Bagnall RD, Semsarian C (2012) Genetic basis of familial valvular heart disease. *Circ Cardiovasc Genet* 5: 569-580
61. Pepe G, Nistri S, Giusti B, Sticchi E, Attanasio M, Porciani C, Abbate R, Bonow RO, Yacoub M, Gensini GF (2014) Identification of fibrillin 1 gene mutations in patients with bicuspid aortic valve (BAV) without Marfan syndrome. *BMC Med Genet* 15: 23
62. Raffetto JD, Khalil RA (2008) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochemical Pharmacology* 75: 346-359
63. Renard M, Callewaert B, Baetens M, Campens L, MacDermot K, Fryns JP, Bonduelle M, Dietz HC, Gaspar IM, Cavaco D, Stattin EL, Schrandt-Stumpel C, Coucke P, Loeys B, De Paepe A, De Backer J (2013) Novel MYH11 and ACTA2 mutations reveal a role for enhanced TGF β signaling in FTAAD. *Int J Cardiol* 165: 314-321
64. Roberts WC (1970) The congenitally bicuspid aortic valve. A study of 85 autopsy cases. *Am J Cardiol* 26: 72-83
65. Roberts WC, Ko JM (2005) Frequency by decades of unicuspid, bicuspid, and tricuspid aortic valves in adults having isolated aortic valve replacement for aortic stenosis, with or without associated aortic regurgitation. *Circulation* 111: 920-925
66. Sabet HY, Edwards WD, Tazelaar HD, Daly RC (1999) Congenitally bicuspid aortic valves: a surgical pathology study of 542 cases (1991 through 1996) and a literature review of 2,715 additional cases. *Mayo Clin Proc* 74: 14-26
67. Sans-Coma V, Fernández B, Durán AC, Thiene G, Arqué JM, Muñoz-Chápuli R, Cardo M (1996) Fusion of valve cushions as a key factor in the formation of congenital bicuspid aortic valves in Syrian hamsters. *Anat Rec* 244: 490-498
68. Schaefer BM, Lewin MB, Stout KK, Gill E, Prueitt A, Byers PH, Otto CM (2008) The bicuspid aortic valve: an integrated phenotypic classification of leaflet morphology and aortic root shape. *Heart* 94: 1634-1638

69. Schwanbeck R, Martini S, Bernoth K, Just U (2011) The Notch signaling pathway: molecular basis of cell context dependency. *Eur J Cell Biol* 90: 572-581
70. Siu SC, Silversides CK (2010) Bicuspid aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol* 55: 2789-2800
71. Stracke JO, Hutton M, Stewart M, Pendás AM, Smith B, López-Otin C, Murphy G, Knäuper V (2000) Biochemical characterization of the catalytic domain of human matrix metalloproteinase 19. Evidence for a role as a potent basement membrane degrading enzyme. *J Biol Chem* 275: 14809-14816
72. van Bogerijen GHW, Tolenaar JL, Grassi V, Lomazzi C, Segreti S, Rampoldi V, Elefteriades JA, Trimarchi S (2013) Biomarkers in TAA-the Holy Grail. *Prog Cardiovasc Dis* 56: 109-115
73. Verma S, Siu SC (2014) Aortic dilatation in patients with bicuspid aortic valve. *N Engl J Med* 370: 1920-1929
74. Wågsäter D, Paloschi V, Hanemaaijer R, Hultenby K, Bank RA, Franco-Cereceda A, Lindeman JH, Eriksson P (2013) Impaired collagen biosynthesis and cross-linking in aorta of patients with bicuspid aortic valve. *J Am Heart Assoc* 2: e000034. doi: 10.1161/JAHA.112.000034.
75. Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JC, Lee ME (1993) Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ Res* 73: 205-209

7. Anhang

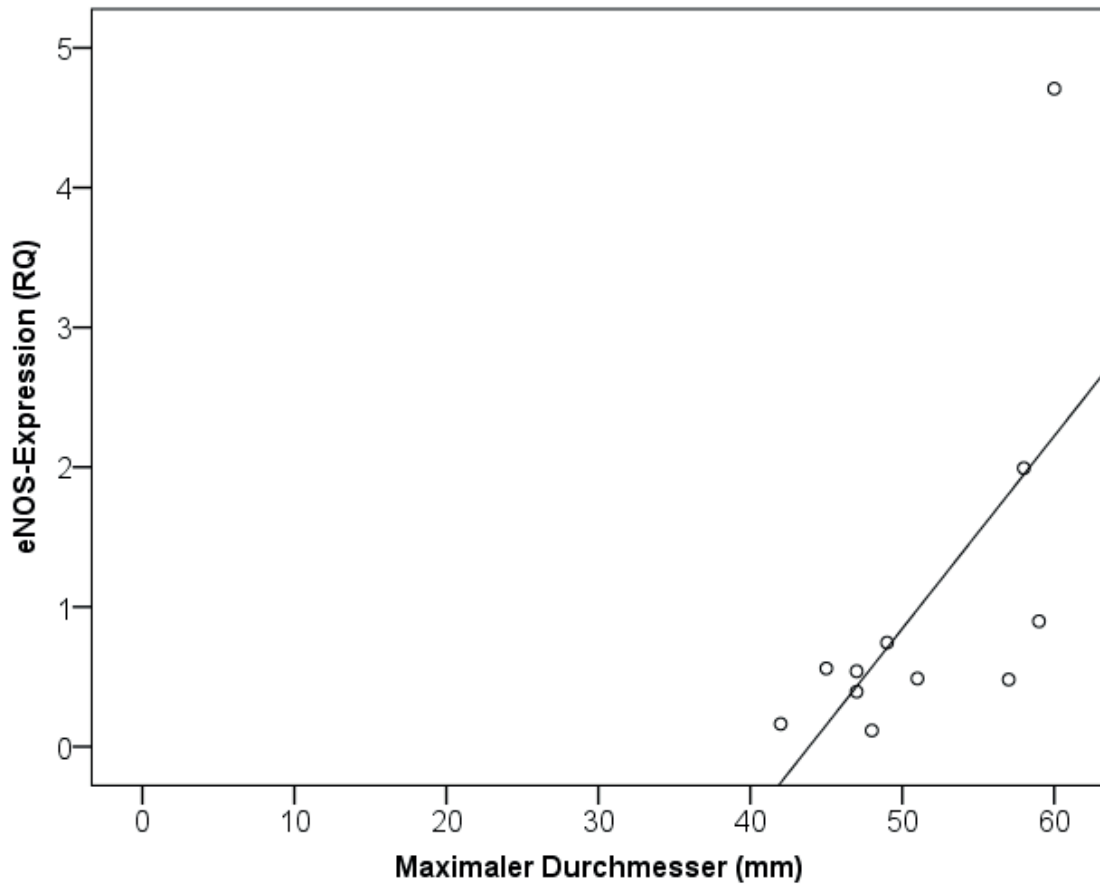


Abbildung i: Korrelation der eNOS-Expression mit dem maximalen Aortendurchmesser bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta ascendens ($r = 0,65$; $p < 0,05$), RQ = relative Quantität der qPCR

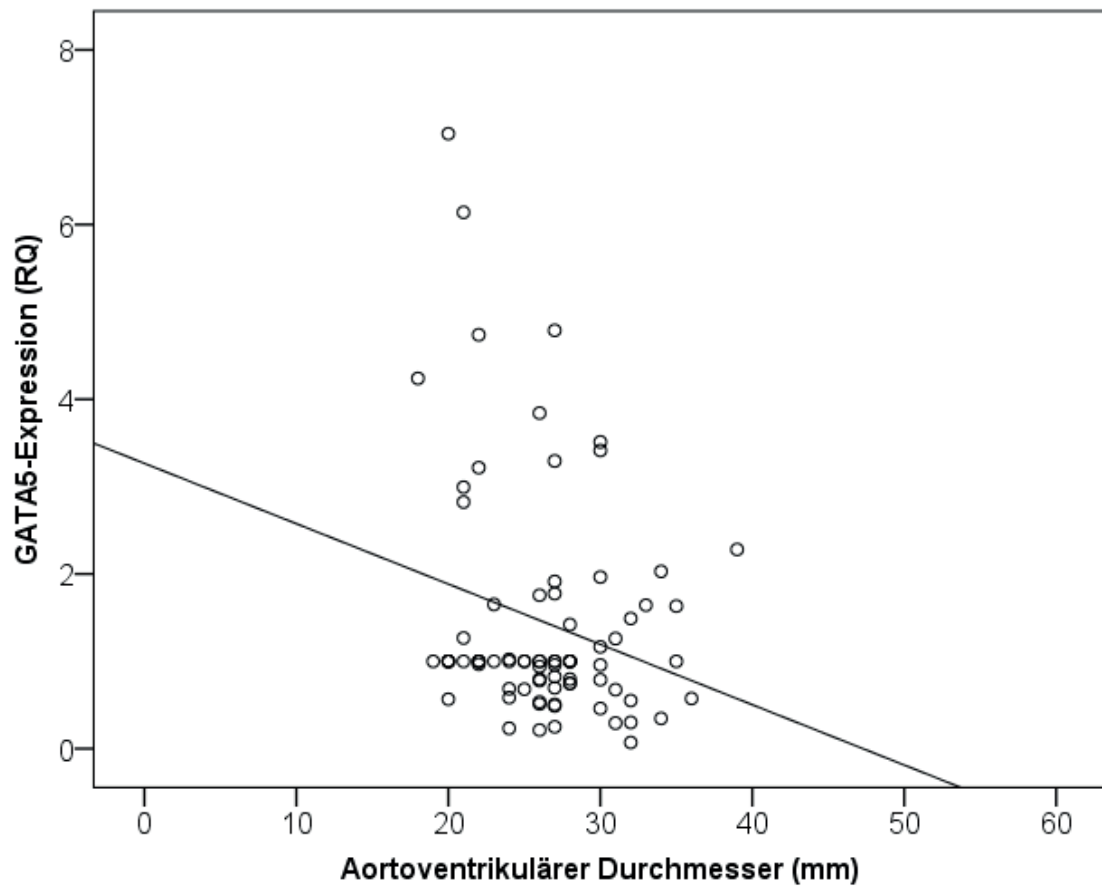


Abbildung ii: Korrelation der GATA5-Expression mit dem aortoventrikulären Durchmesser, unabhängig von der Aortenklappen-Morphologie ($r = -0,33$; $p < 0,05$), RQ = relative Quantität der qPCR

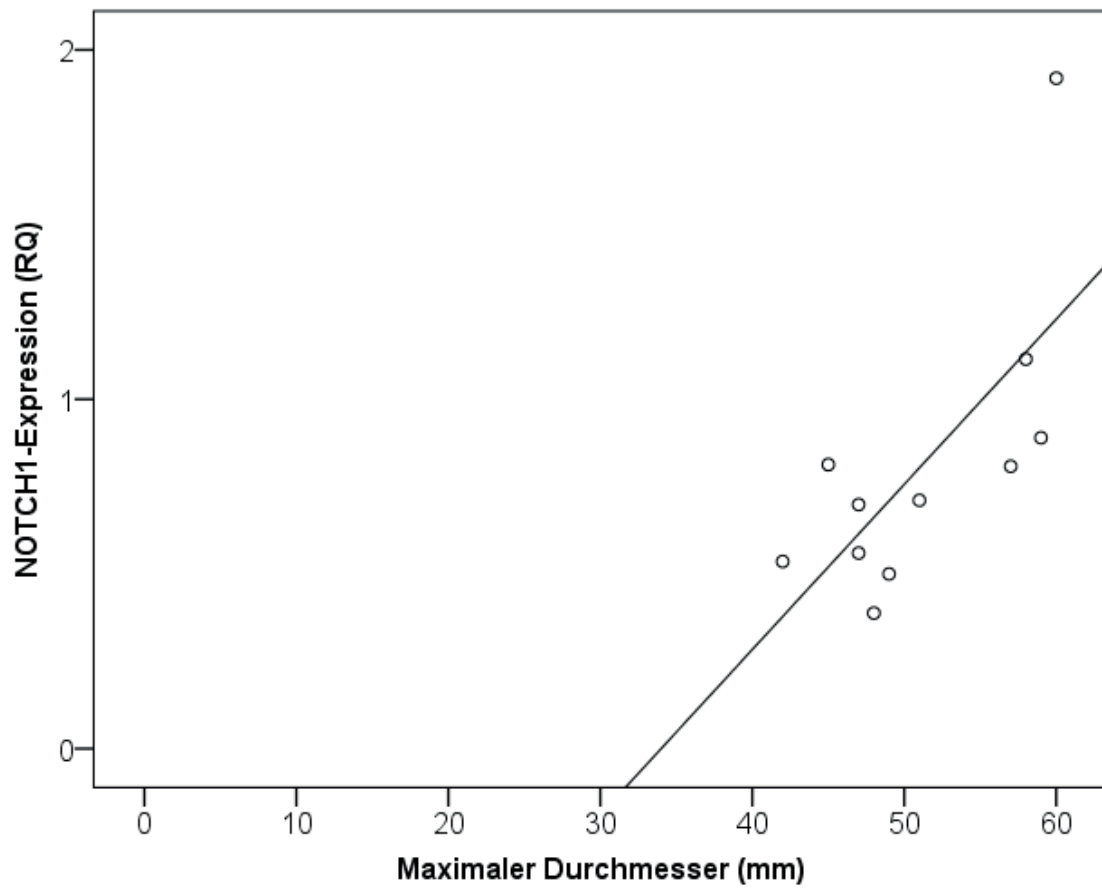


Abbildung iii: Korrelation der NOTCH1-Genexpression mit dem maximalen Aortendurchmesser bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta ascendens ($r = 0,71$; $p < 0,05$), RQ = relative Quantität der qPCR

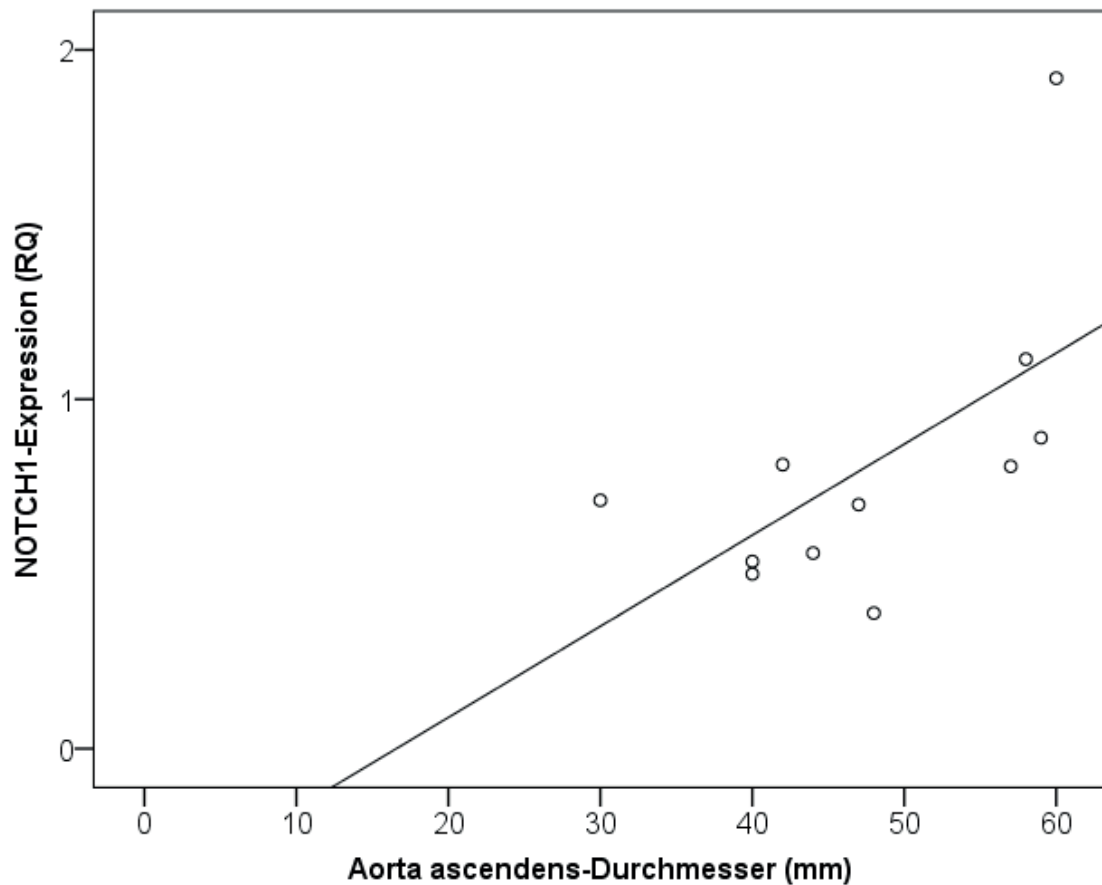


Abbildung iv: Korrelation der NOTCH1-Genexpression mit dem Durchmesser der tubulären Aorta ascendens bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta ascendens ($r = 0,61$; $p < 0,05$), RQ = relative Quantität der qPCR

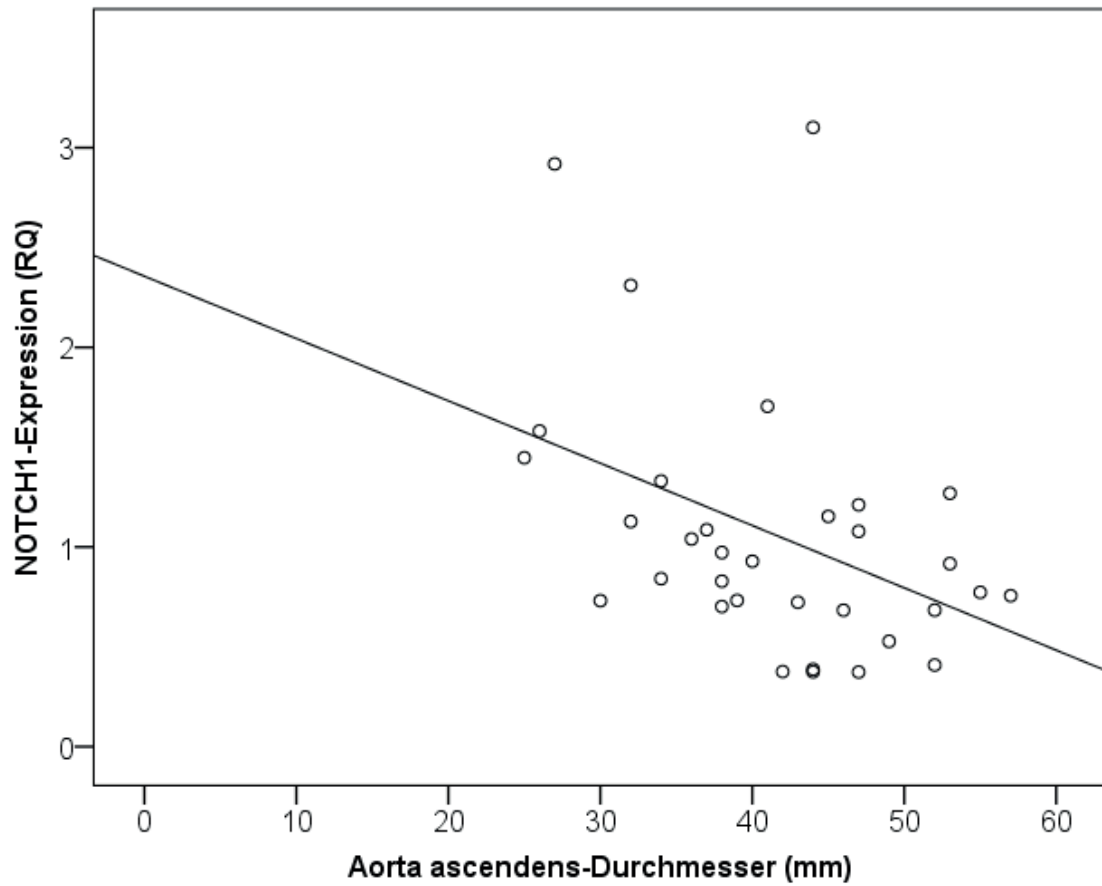


Abbildung v: Korrelation der NOTCH1-Genexpression mit dem Durchmesser der tubulären Aorta ascendens bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen ($r = -0,41$, $p < 0,05$), RQ = relative Quantität der qPCR

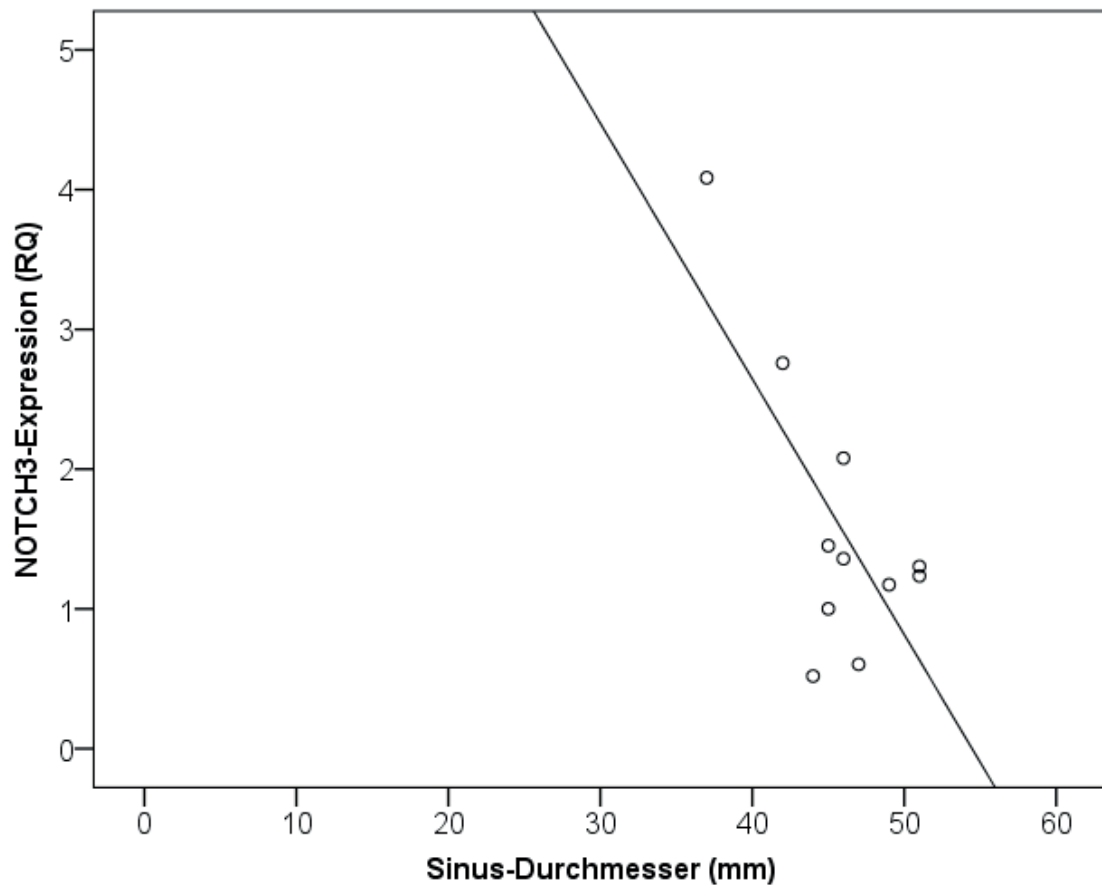


Abbildung vi: Korrelation der NOTCH3-Genexpression mit dem Durchmesser des Sinus Valsalva bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta ascendens ($r = -0,71$; $p < 0,05$), RQ = relative Quantität der qPCR

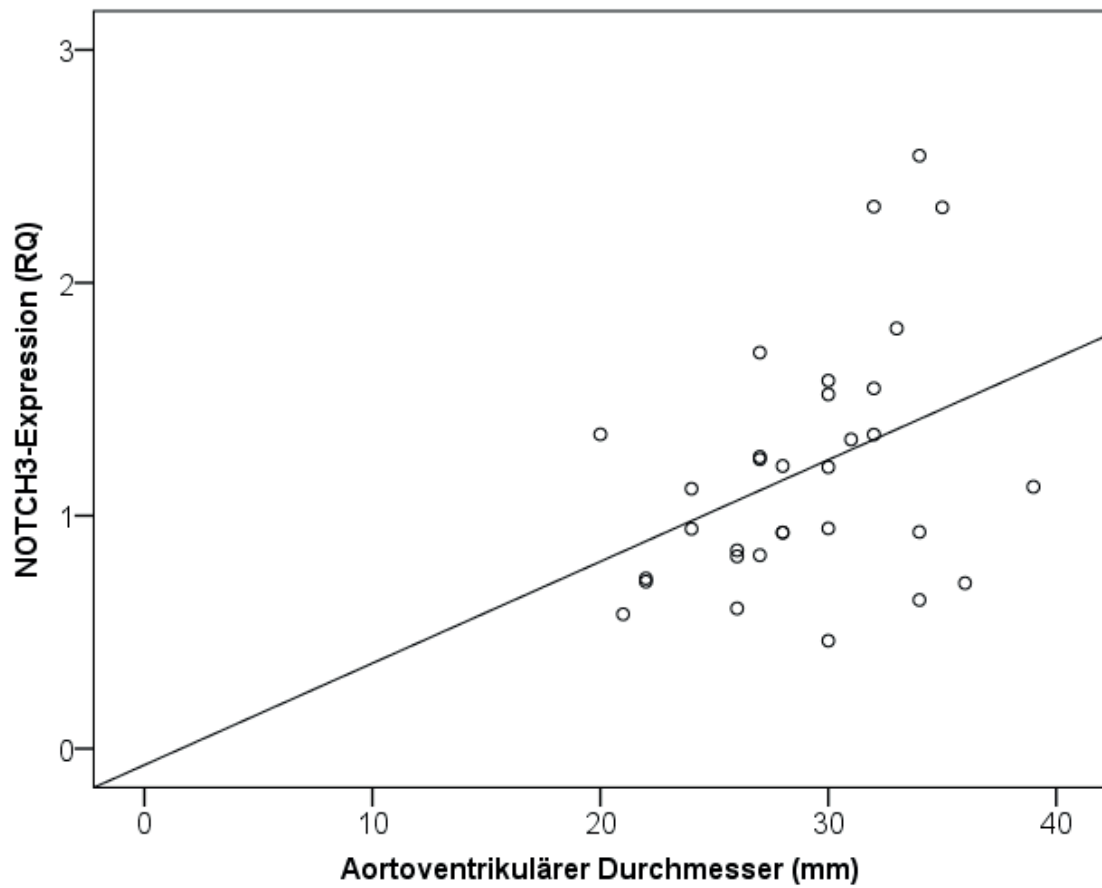


Abbildung vii: Korrelation der NOTCH3-Genexpression mit dem aortoventrikulären Durchmesser bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen ($r = 0,38$; $p < 0,05$), RQ = relative Quantität der qPCR

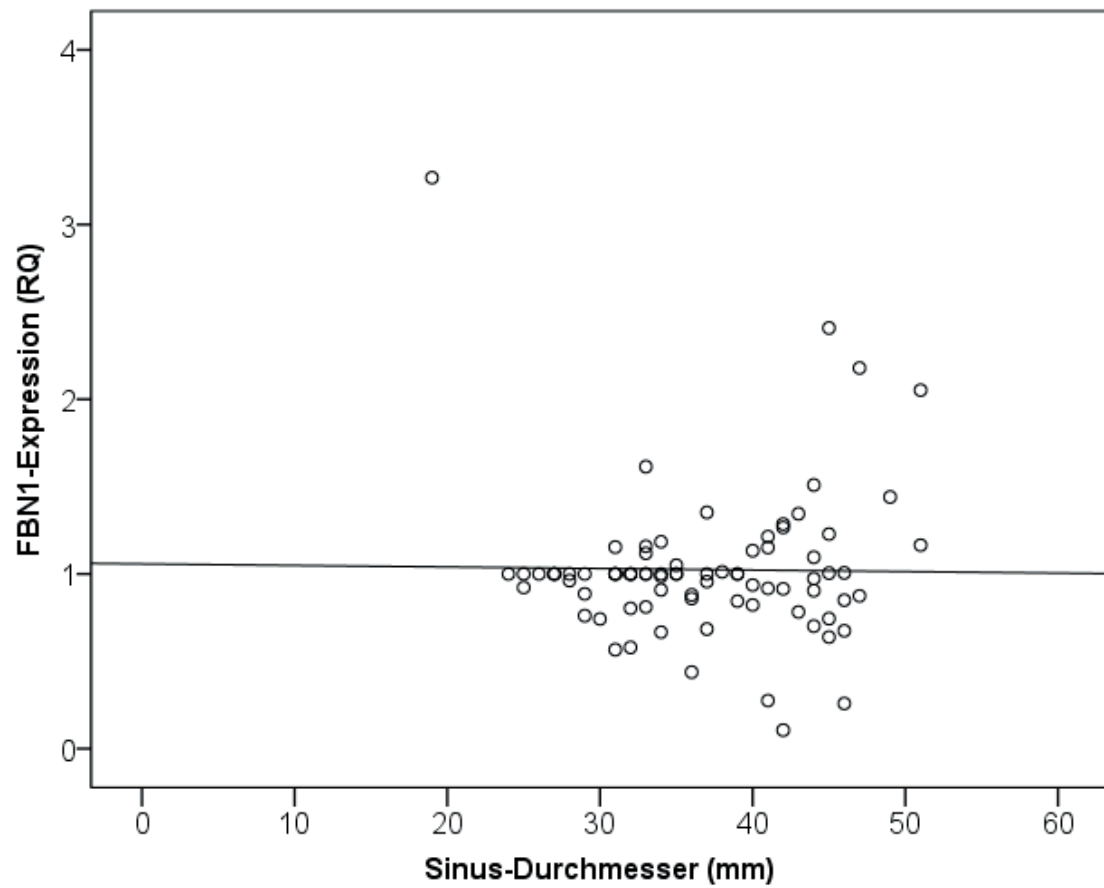


Abbildung viii: Korrelation der FBN1-Genexpression mit dem Durchmesser des Sinus Valsalva, unabhängig von der Aortenklappen-Morphologie ($r = 0,31$; $p < 0,05$), RQ = relative Quantität der qPCR

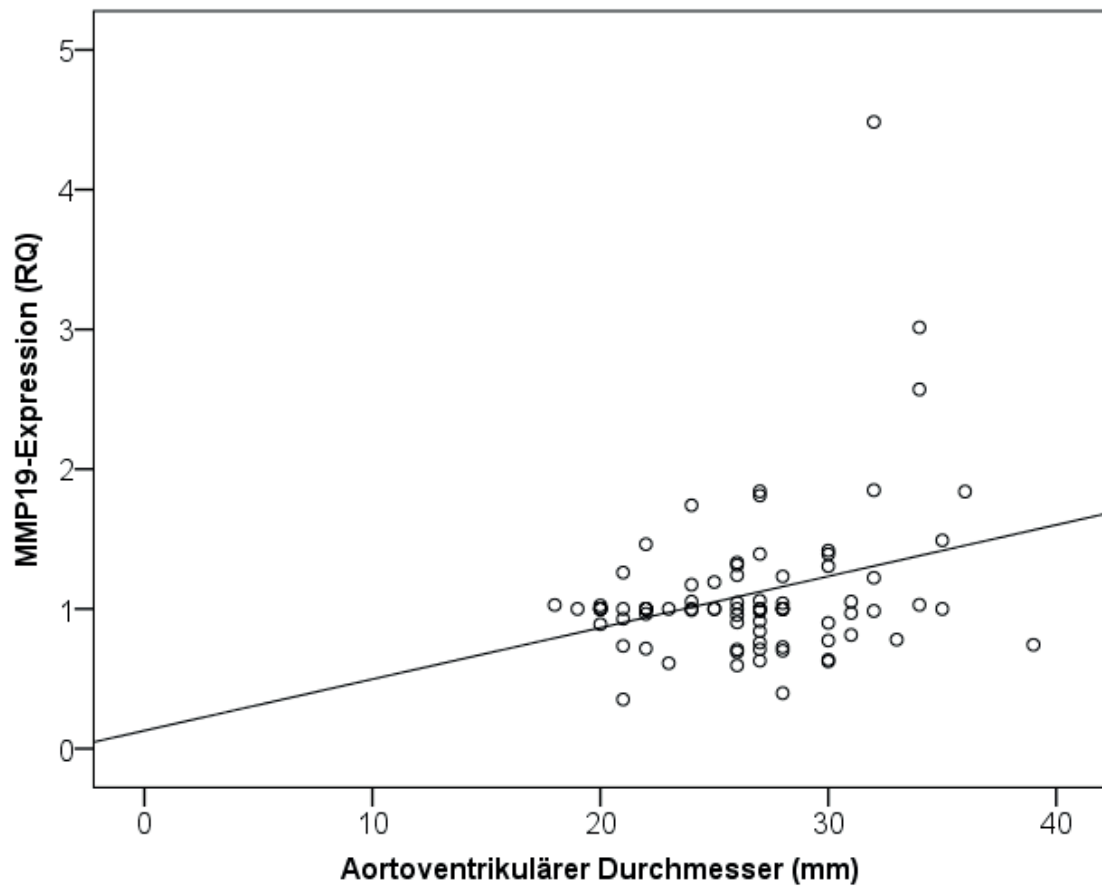


Abbildung ix: Korrelation der MMP19-Genexpression mit dem aortoventrikulären Durchmesser, unabhängig von der Aortenklappen-Morphologie ($r = 0,34$; $p < 0,05$), RQ = relative Quantität der qPCR

8. Publikationen

1. Henn D, Bandner-Risch D, Perttunen H, Schmied W, Porras C, Ceballos F, Rodriguez-Losada N, Schäfers HJ (2013) Identification of reference genes for quantitative rt-PCR in ascending aortic aneurysms. PLoS ONE 8: e54132. doi: 10.1371/journal.pone.0054132.
2. Henn D, Perttunen H, Gauer S, Schmied W, Porras C, Such M, Schäfers HJ (2014) GATA5 and endothelial nitric oxide synthase expression in the ascending aorta is related to aortic size and valve morphology. Ann Thorac Surg 97: 2019-2025

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. H-J. Schäfers, der mir dieses Forschungsprojekt überlassen, mich hervorragend betreut und stets mit neuen Ideen und Ratschlägen unterstützt und inspiriert hat.

Für ihre Unterstützung im Labor möchte ich mich bei Frau Doris Bandner-Risch bedanken. Frau Dr. Noela Rodriguez-Losada danke ich für ihre Hilfe und Anregungen bei der Planung der Experimente. Weiterhin danke ich Herrn Dipl.-Psych. Wolfram Schmied für seine Ratschläge und Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse. Dominic Henn möchte ich für die gute Zusammenarbeit im Labor und die hilfreichen Anregungen danken.

Meinem Vater danke ich für den Rückhalt während meines gesamten Studiums. Meiner bereits verstorbenen Mutter möchte ich für die Zielstrebigkeit danken, die sie mir vorgelebt hat und aus der ich immer wieder Kraft und Inspiration schöpfe.

10. Lebenslauf

| | |
|--------------|---|
| 22.01.1988 | geboren in Toijala, Finnland |
| 2007 | Abitur an der Deutschen Schule Helsinki |
| ab 10/2007 | Medizinstudium an der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar |
| 2009 | Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |
| seit 2010 | Doktorandin an der Klinik für Thorax- und Herz-Gefäßchirurgie der Universität des Saarlandes (Prof. Dr. H.-J. Schäfers) |
| 02/2011 | Forschungsaufenthalt am Dept. of Cardiology Research, Universität Malaga/Spanien |
| 2012-2013 | DAAD-Stipendium Research-Assistantship |
| 05/2014 | Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |
| 06/2014 | Approbation als Ärztin |
| 09/2014 | United States Medical Licensing Examination Step 2CK |
| seit 10/2014 | Assistenzärztin in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe am St. Marienkrankenhaus, Ludwigshafen |

Praktisches Jahr

Klinik für Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin,
Universitätsklinik Homburg/Saar — 02-06/2013
Wahltertial Gynäkologie

Chirurgische Universitätsklinik Homburg/Saar — 06-10/2013
Chirurgie-Tertial

Louisville University Hospital, Louisville, Kentucky, USA — 10-12/2013
Innere-Tertial

Universitätsklinik für Innere Medizin Homburg/Saar — 12/2013-01/2014
Innere-Tertial

Famulaturen

Gynäkologische Gemeinschaftspraxis Dr. med. Jutta Willems-Mink,
Homburg/Saar — 07-08/2010

Universitätsfrauenklinik Freiburg — 03-04/2011

Dept. of Cardiothoracic Surgery, Sahlgrenska University Hospital, Göteborg,
Schweden — 08-09/2011

Klinik für Thorax und Herz-Gefäßchirurgie,
Universitätsklinik Homburg/Saar — 09-10/2011

Dept. of Cardiothoracic Surgery, Dubai Hospital, Dubai, Vereinigte Arabische
Emirate — 03-04/2012

Dept. of Obstetrics & Gynecology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas,
USA — 08-09/2012

Texas Heart Institute, Houston, Texas, USA — 09-10/2012